GENOMISCHE ORGANISATION UND EXPRESSION VON tRNA-GENEN DER HEFE

JOACHIM HAUBER

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554609_0010

Genomische Organisation und Expression von tRNA-Genen der Hefe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Joachim Hauber
aus Stuttgart

Juli 1986

1. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Böck
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K. Wolf
Sondergutachter:	Professor Dr. H. Feldmann

eingereicht am: 18. Juli 1986

Tag der mündlichen Prüfung: 12. August 1986

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Oktober 1983 bis März 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. H. Feldmann danke ich herzlich für seine Unterstützung, Ratschläge und stetigen Interesse während dieser Arbeit. Allen Kollegen der Abteilung danke ich für Diskussionen und gute Zusammenarbeit, besonders meinen Laborkollegen für ihr stetiges Bemühen um ein angenehmes Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....1

2. Ergebnisse.....5
2.1. Etablierung einer Cosmid-Genbank aus Hefe-DNA.....5
2.2. Konstruktion verschiedener DNA-Suchklone.....8
2.3. Isolierung von Cosmidklonen aus der Genbank und Restriktionskartierung ausgewählter Klone.....12
2.4. DNA-Sequenzanalyse der tRNA-Gene.....26
2.5. Untersuchungen der allelischen Situationen bei Ty-Insertionen in der Nachbarschaft von tRNA-Genen...31
2.6. Expressionsstudien am Beispiel eines $tRNA^{Lys}1$-Gens...35
2.6.1. Konstruktion der Oozyten-Mikroinjektionsklone.....35
2.7. Expression des $tRNA^{Lys}1$-Genes nach Mikroinjektion der Plasmide in Xenopus Oozyten.....39

3. Diskussion.....42
3.1. Güte der Cosmid-Genbank.....42
3.2. Kontrollregionen für die Transkription von eukaryotischen tRNA-Genen.....44
3.3. Genomische Organisation der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie aus Hefe.....47
3.4. Weitere Charakterisierung der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie 50
3.5. Komplexe Organisationsmuster von tRNA-Genen und repetitiven Elementen am Beispiel der Klone CYH7 und CYH118.....51
3.6. Entstehung von homo- und heterozygoten Ty-Insertionen.....55
3.7. Differentielles Expressionsverhalten eines tRNA-Genes.....56

4. Material und Methoden.....61
4.1. Material.....61
4.2. Methoden.....63
4.2.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe.....63
4.2.2. Partialverdau der hochmolekularen Hefe-DNA.....64
4.2.3. Konstruktion der Vektorarme.....65
4.2.4. Ligierung von Vektor- und Donor-DNA.....66
4.2.5. Präparation der Extrakte zur in vitro Verpackung von Cosmid-DNA in Phagenhüllen.....66
4.2.6. in vitro Verpackung von Cosmid-DNA in Phagenhüllen...66
4.2.7. Transduktion.....67
4.2.8. Koloniefilterhybridisierung der Cosmid-Genbank.....67
4.2.9. Radioaktive Markierung von DNA.....68
4.2.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen.....68
4.2.11. Transfer von DNA aus Gelen auf eine Membran zur Hybridisierung.....68
4.2.12. Subklonierung von DNA-Fragmenten.....69
4.2.13. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....70
4.2.14. Transfektion von Bakterien mit Phagen-DNA.....70
4.2.15. Isolierung von Cosmid-, Plasmid- und Phagen-DNA.....70
4.2.16. Schnelle Restriktionskartierung von Cosmid-DNA.....71
4.2.17. DNA-Sequenzierung.....71
4.2.18. Mikroinjektion in Xenopus Oozyten und Analyse der RNA.....71
4.2.19. Biologische Sicherheit.....72

5. Zusammenfassung.....73

6. Literaturverzeichnis.....76

7. Abkürzungsverzeichnis.....83

Lebenslauf

1. Einleitung

Die kontrollierte Expression eukaryotischer Gene ist noch weitgehend unverstanden. In besonderem Maße kompliziert ist die Regulation der Genexpression bei Multigenfamilien, wie sie u.a. die tRNA-Gene in eukaryotischen Organismen darstellen. Ihre besondere Bedeutung wird dadurch hervorgehoben, daß es sich bei den tRNA's um Moleküle handelt, denen in der Proteinbiosynthese eine grundlegende Funktion zukommt.

Prokaryoten enthalten für eine bestimmte tRNA-Spezies nur ein einziges oder sehr wenige Gene, die manchmal in Tandemanordnungen anzutreffen sind (1,2). Im Gegensatz dazu zeigen, soweit man heute übersehen kann, die redundanten tRNA-Gene der Eukaryoten eine grundsätzlich andere Organisation. Sie stellen singuläre Transkriptionseinheiten dar (3), deren Anordnung aber trotzdem in einzelnen Organismen typisch variiert (4-16).

Für die menschlichen $tRNA^{Met}$-Gene konnte eine disperse Genomverteilung beobachtet werden (4). In der Ratte treten nebeneinander angeordnete sowie dispers verteilte tRNA-Gene auf (5,6). Für Drosophila liegen ausführlichere Ergebnisse vor. Es wurden dort 600 - 800 tRNA-Gene gefunden (7,8), welche 50 verschiedenen Familien zugeordnet werden konnten. Diese Gene werden an bestimmten genomischen Orten gehäuft vorgefunden. Solche Anhäufungen können verschiedene tRNA Spezies in mehreren Kopien (9-11), oder auch nur redundante Kopien einer bestimmten tRNA-Multigenfamilie (12), enthalten. Die disperse Genanordnung von tRNA-Genen konnte in Drosophila ebenfalls beschrieben werden (13).

Die meisten experimentellen Daten existieren für die Hefe Saccharomyces cerevisisae. In ihr ließen sich durch Hybridisierungsexperimente etwa 360 tRNA-Gene nachweisen (14-16). Von jedem der verschiedenen Gene existieren im Durchschnitt 10 - 12 Kopien, die in der Regel über das gesamte Genom verteilt sind. So konnte für 8 Gene, die für die $tRNA^{Tyr}$ kodieren, nachgewiesen werden, daß sie auf 6 verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (17,18).

Solch eine disperse Verteilung wird auch bei Genen für die $tRNA^{Ser}$ (19,20), die $tRNA^{Met}$ (21), die $tRNA^{Phe}$ (22) und für die $tRNA^{Glu}3$ gefunden. Letztere Befunde wurden durch frühere Arbeiten aus dem Labor von H. Feldmann erhalten (23-26).

Trotz dieser Vielfalt in der genetischen Anordnung zeigen die eukaryotischen tRNA-Gene ein für die korrekte Expression notwendiges gemeinsames Charakteristikum. Die Transkription durch die RNA-Polymerase III ist hauptsächlich von zwei genetischen Strukturelementen abhängig: dem Promotor und dem, der die tRNA kodierenden Sequenz nachfolgenden, Terminationssignal. Dieses ist durch mindenstens 5 A/T-Basenpaare gekennzeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß der Promotor im Gen selbst, unterteilt in zwei Abschnitte, vorliegt (27-34). Diese ließen sich auf einen Bereich im Dihydrouracil-Arm, und auf einen Bereich im Pseudouridin-Arm der tRNA festlegen. Diese Bereiche sind in allen tRNA-Molekülen in ihrer Sequenz stark konserviert (27-34).
Um die Frage zu beantworten, ob die eukaryotischen tRNA-Gene über ihre intragenischen Promotorbereiche konstitutiv exprimiert werden, oder ob sie einer regulierten Genexpression unterliegen, untersuchen neuere Arbeiten den Einfluß der tRNA-Genflanken auf die Expression dieser Gene. Diese Ergebnisse zeigen, daß neben den essentiellen Promotorelementen die "Umgebung" von eukaryotischen tRNA-Genen einen modulierenden Einfluß auf die tRNA-Genexpression ausübt (35-38). Neuerdings isolierten G. Arnold et al. zwei menschliche $tRNA^{Val}$-Gene mit unterschiedlichen Genflanken, die in einem HeLa-System verschieden stark exprimiert werden (35). Durch den gegenseitigen Austausch der die tRNA-Gene flankierenden Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die unterschiedliche Expression nicht vom Gen-Strukturteil, sondern von den verschiedenen Genflanken herrührt.
Für <u>Saccharomyces cerevisiae</u> zeigte eine ganze Reihe von Arbeiten, daß vor dem Gen liegende (5'-flankierende) Bereiche die tRNA-Genexpression beeinflussen können (36-38).
Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die tRNA-Genexpression einer Regulation unterliegt und den Genflanken dabei eine bestimmte Aufgabe zukommt.

In diesen, die tRNA-Gene flankierenden Bereichen, werden in der Hefe sehr oft transposable Elemente gefunden (24,39-44). Dies können komplette Ty-Elemente (45), singuläre Delta-Sequenzen (45,46) oder die Elemente Sigma (40) oder Tau (42,43) sein. Es können Allele existieren, wobei eines von ihnen ein Element inseriert hat, während es im anderen Allel fehlt (42,43,47).

Ty-Elemente (48-51) wurden ursprünglich in Assoziation mit für Proteine codierenden Genen (HIS3, HIS4, CYC7) aus entsprechenden Mutanten isoliert. Sie zeigen eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit transposablen repetitiven Elementen aus Drosophila (52) und retroviralen Proviren (53). Die Analogie beinhaltet die Transposition über eine RNA-Zwischenstufe (54) und die Bildung von Retrovirus-ähnlichen Partikeln, welche Ty-RNA und Reverse Transkriptase Aktivität enthalten (55,56). Nach einem Transpositionsereignis und der Insertion eines Elementes entstehen direkte Wiederholungen von 5 bp Länge am Insertionsort (57,58).

Ty-Elemente sind zudem fähig, Rekombinations- oder Genkonversionsereignisse zu vermitteln, welche dann zu Deletionen, Duplikationen, Inversionen und reziproken Translokationen führen (59,60).
In den meisten Hefestämmen repräsentieren die Ty-Elemente eine heterogene Familie (61) mit ungefähr 35 Mitgliedern. Die meisten von ihnen haben eine Länge von 5,9 kb und sind von langen direkten Wiederholungen, den Delta-Elementen mit einer Größe von 330 - 340 bp, begrenzt (46,62). Neuere Ergebnisse zeigen, daß bestimmte Sequenzen innerhalb der Ty-Elemente in die Kontrolle oder Verstärkung der Expression benachbarter Gene involviert sind (63,64).

Delta-Sequenzen erscheinen für sich allein (solo-Delta's) in ungefähr 100 Kopien im haploiden Hefe-Genom. Man sieht im allgemeinen in ihnen Relikte früherer Rekombinationsereignisse, wobei die endständigen Delta-Elemente eines Ty-Elementes bei dessen Excision miteinander rekombinierten. Sie zeigen untereinander nur eine partielle Sequenzhomologie und erscheinen auch in "verstümmelten" Versionen (25,39,65).

Die Sigma-Elemente haben eine Größe von 340 bp und erscheinen ungefähr in 35 Kopien im haploiden Genom (40), während die Tau-Elemente 371 bp lang sind und in 20 - 30 Kopien erscheinen (43). Diese beiden Element-Klassen wurden bisher nur in der direkten Nachbarschaft von tRNA-Genen nachgewiesen.

Auch zeigen alle diese Elemente die für transposable Elemente typische, kurze direkte Verdoppelung der Ziel-Sequenzen am Insertionsort (52,53,60).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine möglichst vollständige tRNA-Multigenfamilie auf genomischer Ebene zu beschreiben. Besonders sollte dabei untersucht werden, wie viele Mitglieder dieser tRNA-Multigenfamilie mit transposablen Elementen vergesellschaftet sind.
Weiterhin sollte der Einfluß solcher transponierbarer repetitiver Elemente auf die Expression eines tRNA-Genes untersucht und die darin involvierten Strukturelemente charakterisiert werden.

2. Ergebnisse

Das experimentelle Vorgehen konzentrierte sich auf zwei Schwerpunkte. Da erste Informationen über die $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie durch frühere Arbeiten aus dem Labor von H. Feldmann schon vorlagen (23-26), galt ein Aspekt der molekularen Organisation dieser Gene. Im besonderen sollte dabei untersucht werden, mit welcher Häufigkeit die repetitiven Hefe-Elemente Delta, Sigma, Tau und Ty in den tRNA-Genflanken lokalisiert sind. Hier konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Konstruktion und Bearbeitung einer Genbank. Letzteres geschah durch das Absuchen der Genbank mit Hybridisierungsproben und der Isolierung spezifischer Klone. Diese ausgewählten Klone wurden durch Restriktionskartierung und DNA-Sequenzbestimmung bearbeitet.
Der andere Aspekt galt Untersuchungen zur Funktion bestimmter spezifischer Anordungen von tRNA-Genen und repetitiven Elementen. Hierzu wurden, ausgehend von vergleichbaren Wildtypsituationen, in vitro Mutanten konstruiert, um den Einfluß eines Elementes auf die tRNA-Genexpression zu studieren. Die Expression dieser Mutanten wurde nach Mikroinjektion in Xenopus laevis Oozyten untersucht.

2.1. Etablierung einer Cosmid-Genbank aus Hefe-DNA

Als Grundlage für alle weiteren Arbeiten, d.h. für die Isolierung verschiedener Gene, mußte eine repräsentative Genbank aus Hefe-DNA etabliert werden. Da möglichst große DNA-Fragmente kloniert werden sollten, bot sich als Vektor ein Cosmidsystem an.
Cosmide sind künstliche Fusionsvektoren, die DNA-Sequenzen aus dem Phagen λ (cos-Stelle) und aus Plasmiden (Replikationsursprung, Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker) enthalten. Nach einer in vitro Verpackung in Phagenhüllen lassen sich die Cosmide mit sehr hoher Effizienz in E. coli Wirtszellen

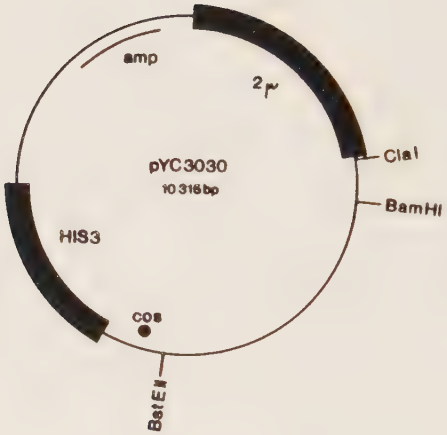

Abbildung 1: Physikalische Karte des Cosmidvektores pYC3030.

Hefe-DNA-Sequenzen (2μ-Replikationsursprung, HIS3-Gen) sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Die Lage der cos-Stelle ist eingezeichnet. Als Vektorarme wurden die, jeweils die cos-Stelle enthaltenden, ClaI x BamHI- bzw. BstEII x BamHI-Fragmente verwendet. Die mit der Restriktionsendonuklease Sau3A partialverdaute Hefe-DNA wurde in die BamHI Stelle kloniert.

einbringen (66,67). Im Wirt selbst lassen sie sich dann wie Plasmide handhaben. Mit diesem Vektorsystem ist es möglich, genomische DNA-Fragmente in einer Größenklasse von 35 - 45 kb in E. coli zu vermehren.

Um sich vielfältige Möglichkeiten der Verwendung einzelner Cosmidklone aus der Genbank in zukünftigen Projekten offenzuhalten, wie die direkte Transformation von Hefe mit diesen Cosmidklonen, wurde der Vektor pYC3030 (68) gewählt. Neben den oben beschriebenen, allen Cosmiden eigenen Charakteristika, trägt pYC3030 noch zusätzlich zwei Hefe-DNA-Bereiche (Abb. 1): den Replikationsursprung des 2µ-Hefeplasmides und als Selektionsmarker das HIS3-Gen. Es läßt sich neben dem Prokaryoten E. coli mit diesem System deshalb auch der Eukaryot Saccharomyces cerevisiae transformieren.

Für die hier beschriebene Genbank wurde mit der Restriktionsendonuklease Sau3A partialverdaute, hochmolekulare Hefe-DNA aus dem Stamm C836 in die singuläre BamHI-Stelle des Cosmidvektors pYC3030 kloniert. Zur Herstellung der Vektorarme wurde das jeweils die cos-Stelle enthaltende ClaI x BamHI bzw. BstEII x BamHI Fragment aus pYC3030 verwendet (Abb. 1). Experimentell wurde wie in Material und Methoden unter 4.2.1. bis 4.2.7. beschrieben vorgegangen.

Durch den Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease Sau3A, welche eine Tetranukleotidsequenz erkennnt, erhält man überlappende DNA-Fragmente, wobei jede bestimmte Sequenz redundant, d.h. durch mehrere überlappende Cosmideinzelklone, erhalten wird. Somit ergibt sich bei diesem Klonierungsprinzip auch die Möglichkeit, von einem Punkt aus, mit Hilfe der "Chromosomal walking"-Technik (69-72) große genetische Bereiche durch eine Serie von Cosmidklonen zu überdecken.
Um Klonierungsartefakten, wie sie in den Anfängen der Cosmidtechnik oft beschrieben wurden (73), vorzubeugen, wurden sämtliche Kontrollversuche durchgeführt:

- Test des Wirtsstammes auf recA$^-$ Status,
- Isolierung und Phosphatasebehandlung der benötigten Vektorarme,
- Größenfraktionierung und Dephosphorylierung der zu klonierenden Donor-DNA,
- Test auf Ligierbarkeit der Vektor-DNA bzw. Unfähigkeit zur Koncatemerbildung der Donor-DNA,
- Test der Güte der in vitro Verpackungsextrakte.

2.2. Konstruktion verschiedener DNA-Suchklone

Um verschiedene Mitglieder der tRNA^{Glu}3-Multigenfamilie als Cosmidklone aus der Genbank zu isolieren, und um ihre genomische Organisation in Bezug auf repetitive Elemente in der 5'- bzw. 3'-Genflanke festzulegen, mußten verschiedene DNA-Suchklone konstruiert werden. Sämtliche Suchklone wurden im M13 Phagen-System (74) etabliert. Eine Kreuzhybridisierung zwischen M13-DNA und Cosmid pYC3030-DNA bzw. Hefe-DNA wurde in einem Hybridisierungsexperiment ausgeschlossen (vgl. 4.2.11.).

Der Suchklon für das tRNA^{Glu}3-Gen wurde als 294 bp MboII x RsaI Fragment aus dem Klon pY5 von A. Eigel und H. Feldmann (25) gewonnen und mit Hilfe von T4-DNA-Polymerase, welche 3'-Überhängende Enden in glatte Enden umwandelt, in die SmaI Stelle von M13mp8 kloniert.

Für den Hybridisierungsnachweis von Delta-Elementen wurden zwei Suchklone konstruiert. Aus dem Klon pY102, ebenfalls von A. Eigel und H. Feldmann (25) beschrieben, wurde ein 860 bp HindIII x Sau3A Fragment, welches zwei Delta-Elemente umfaßt, in die HindIII x BamHI Stellen von M13mp8 kloniert. Aus dem Klon pY109 (47) wurde ein 660 bp PvuII x BglII Fragment, welches Bestandteil eines Ty-Elementes ist, in die HindII x BamHI Stellen des Phagen M13mp8 kloniert.

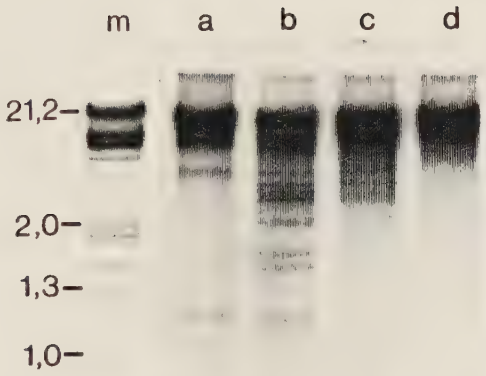

Abbildung 2: Filterhybridisierungsanalyse von genomischer C836-DNA.

10µg genomischer C 836-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen BamHI (a), HindIII (b), PstI (c) und EcoRI (d) gespalten. Nach Transfer auf einen Nitrozellulosefilter wurde dieser mit dem Suchklon für **Sigma**-Elemente hybridisiert. λ-DNA (verdaut mit HindIII x EcoRI) wurde als Längenstandard (m) verwendet; eine Hybridisierung mit radioaktiv markierter λ-DNA machte die Fragmente sichtbar. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Der Suchklon für die interne **Epsilon**-Sequenz aus Ty-Elementen wurde ebenfalls aus pY109 gewonnen: ein 1,7 kb ClaI x PstI Fragment wurde nach Auffüllen des 5'-überhängenden ClaI-Endes mit T4-DNA-Ligase in die BamHI x PstI Stellen von M13mp8 ligiert.

Sigma-Elemente wurden nachgewiesen, indem aus dem Klon pY66 von P. Nelböck und H. Feldmann (75) ein 328 bp HaeIII x HpaII Fragment mit Sigma Sequenzen, ebenfalls nach dem Auffüllen der überhängenden HpaII-Enden durch Klenow-Polymerase, in die SmaI Stelle von M13mp10 mit T4-DNA-Ligase kloniert wurde.

Der Suchklon, welcher **Tau**-Element-Sequenzen enthielt, wurde aus dem Klon pGC106 erhalten. Ein 292 bp AccI x ClaI Fragment wurde durch die Verwendung von Klenow-Polymerase in ein Fragment mit glatten Enden umgewandelt; dieses wurde anschließend mit T4-DNA-Ligase in die SmaI Stelle von M13mp8 kloniert. Der Ausgangsklon pGC106 wurde freundlicherweise von T.C. Cooper (42,43) zur Verfügung gestellt.

Die Spezifität der einzelnen Suchklone wurde überprüft, indem ihre DNA-Sequenz, mittels der "Didesoxy-Kettenabbruch"-Methode nach Sanger et al. (76), bestimmt wurde.

Somit standen DNA-Hybridisierungsproben für die $tRNA^{Glu}{}_3$-Multigenfamilie sowie die repetitiven Elemente Delta, Sigma, Tau und Ty zur Verfügung. Für Hybridisierungsexperimente wurde immer die doppelsträngige Phagen M13-RF DNA mittels "Nicktranslation" (vgl. 4.2.9.) radioaktiv markiert.

Um den repetitiven Charakter der einzelnen Suchklone zu verifizieren, wurde genomische C836-DNA, gespalten mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI, HindIII und PstI, einer Hybridisierungsanalyse mit diesen Proben, wie in 4.2.12. beschrieben, unterworfen (vgl. Abb. 2 und 3).

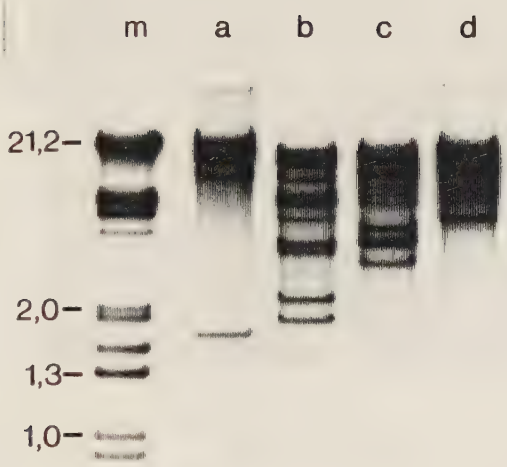

Abbildung 3: Filterhybridisierungsanalyse von genomischer C836-DNA.

Je 10µg C 836-DNA, gespalten mit den Enzymen BamHI (a), EcoRI (b), HindIII (c) und PstI (d), wurden mit dem Suchklon für **Tau**-Elemente hybridisiert. λ-DNA (verdaut mit HindIII x EcoRI) wurde als Längenstandard (m) verwendet; eine Hybridisierung mit radioaktiv markierter λ-DNA machte die Fragmente sichtbar. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

2.3. Isolierung von Cosmidklonen aus der Genbank und Restriktionskartierung ausgewählter Klone

Die Cosmidgenbank wurde mit dem Suchklon für die $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie abgesucht (vgl. 2.2.). Da alle Hefe DNA-Sequenzen in der Genbank sicher repräsentiert sein sollten (vgl. 3.1.), wurden 200 000 zufällige Cosmidklone durch Koloniefilterhybridisierung (4.2.8.) getestet. 153 hybridisierungspositive Cosmidklone wurden auf diese Weise isoliert und weiter bearbeitet.

Bedingt durch das Konstruktionsprinzip der Genbank beinhalten manche Klone denselben Locus als überlappendes DNA-Fragment. Um diese Klone zu identifizieren, wurden alle 153 rekombinanten Cosmidklone vielfältigen Restriktionsanalysen unterworfen und mit der $tRNA^{Glu}3$-DNA-Probe hybridisiert. Die, auf die $tRNA^{Glu}3$-Loci bezogenen, redundanten Klone wurden ausgesondert.
Diese Einengung führte zu 9 Cosmidklonen, die durch Erstellung der Restriktionskarte für die Nukleasen BamHI, ClaI, HindIII, SalI und XhoI charakterisiert wurden. Die Spaltstellen wurden durch Einzelverdaue und sämtliche möglichen Doppelverdaue mit den oben erwähnten Nukleasen durchgeführt. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente in Agarosegelen wurden sie auf Nitrozellulosefilter transferiert und in jedem Fall mit dem Suchklon für die $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie und dem Cosmidvektor pYC3030 hybridisiert. Das Hybridisierungsexperiment mit dem Vektor erleichterte die Cosmidkartierung, weil dadurch bestimmte Banden definierten Vektorfragmenten zugeordnet werden konnten.

Zusätzlich wurden sämtliche Nitrozellulosefilter von Restriktionsanalysen der Cosmide mit den DNA-Suchklonen für die repetitiven Elemente Delta, Sigma, Tau und Ty (inneres Segment) hybridisiert.

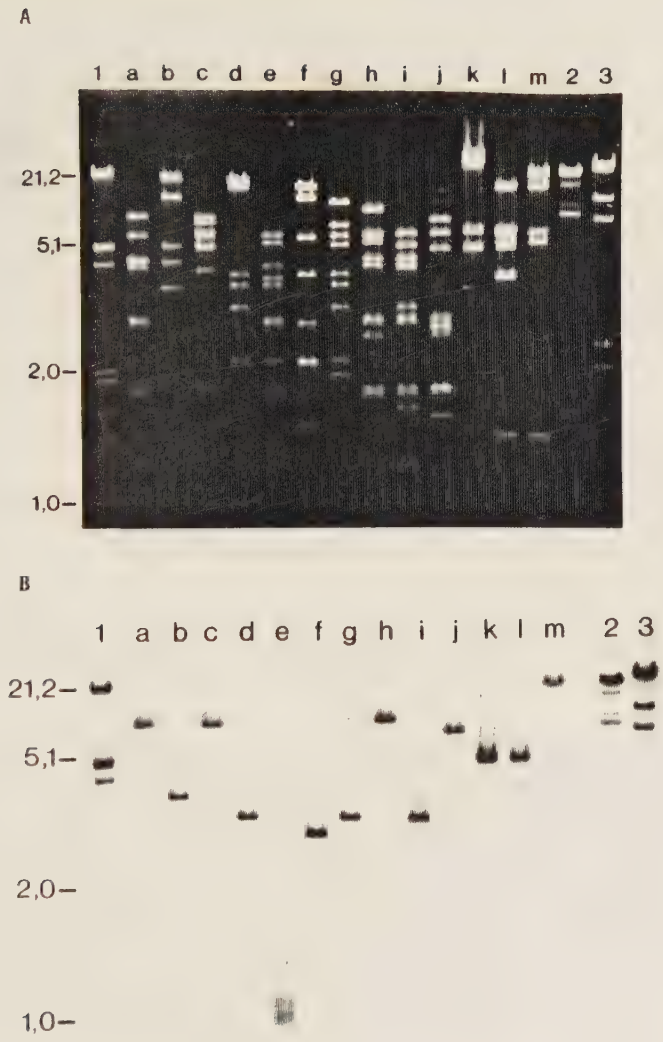

Abbildung 4 (Bildlegende umseitig)

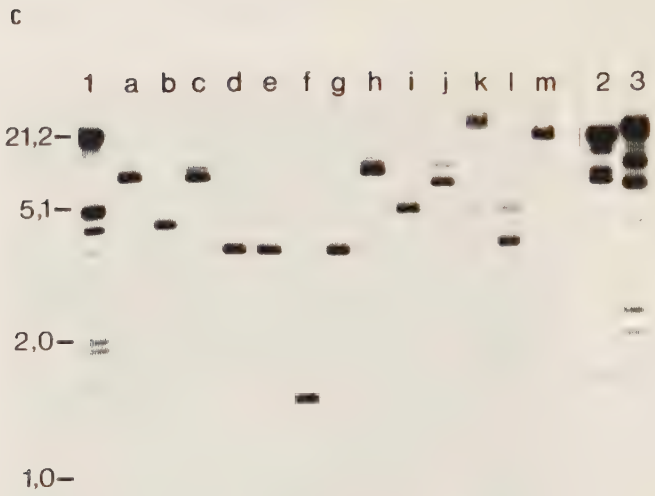

Abbildung 4: Exemplarisches Beispiel eines Cosmid-Kartierungsgeles und seiner Hybridisierung mit verschiedenen Suchklonen.

Abbildung 4-A: je 0,5 µg CYH118-DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisiert.
Restriktionsspaltungen: a: BamHI x HindIII; b: BamHI x SalI; c: BamHI x XhoI; d: ClaI; e: ClaI x HindIII; e: ClaI x SalI; f: ClaI x XhoI; g: HindIII; h: HindIII x SalI; i: HindIII x XhoI; k: SalI; l: SalI x XhoI; m: XhoI.
Die Spalten 1, 2 und 3 zeigt λ-DNA gespalten mit verschiedenen Restriktionsenzymen als Markerfragmente: 1: EcoRI x HindIII; 2: StuI; 3: HindIII. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.
Abbildung 4-B: Hybridisierung des beschriebenen Kartierungsgeles nach Transfer auf Nitrozellulosefilter mit dem DNA-Suchklon für die **tRNA(Glu)3**-Multigenfamilie. Die Markerfragmente wurden durch eine zweite Hybridisierung mit radioaktiv markierter λ-DNA sichtbar gemacht.
Abbildung 4-C: Hybridisierung des Nitrozellulosefilters des beschriebenen Kartierungsgeles mit dem DNA-Suchklon für **Epsilon**-Sequenzen (Ty inneres Segment).

Im Zweifelsfall wurden ausgewählte Cosmidklone noch durch die "schnelle Restriktionskartierung" nach H. Lehrach (79) analysiert (vgl. 4.2.16.). Dazu wurde zirkuläre Cosmid-DNA an der cos-Stelle durch einen selbsthergestellten Terminase-Extrakt (80) linearisiert und einem Partialverdau mit einem Restriktionsenzym unterworfen. Das Fragmentgemisch wurde anschließend mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, welche entweder zur rechten oder linken cos-Stelle komplementär sind, hybridisiert und auf Agarosegelen aufgetrennt. Nach dem anschließenden Trocknen der Gele wurde von diesen eine Autoradiographie angefertigt, auf der die Restriktionsspaltstellen direkt abgelesen werden konnten (Abb. 13).

Um die kartierten Cosmidklone noch genauer zu beschreiben, wurden von ihnen geeignete HindIII bzw. BamHI Fragmente, welche jeweils ein $tRNA^{Glu}3$-Gen und eventuell assoziierte repetitive Elemente enthielten, in den Plasmidvektor pBR322 (77,78) subkloniert. Diese Plasmidklone wurden mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, BglII, ClaI, EcoRI, HindIII, PstI, PvuII, SacI, SalI, SmaI, StuI, XbaI und XhoI ebenso, wie oben für die Cosmide beschrieben, kartiert.

Weiterhin war von Interesse, ob neben den klonierten Mitgliedern der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie noch andere tRNA-Gene auf den bearbeiteten Cosmiden lokalisiert sind. Restriktionsanalysen der Cosmid-DNA's durch die Nukleasen BamHI und HindIII wurden einem Hybridisierungsgemisch mit durch ^{125}I-markierter Gesamt-tRNA aus Hefe ausgesetzt (4.2.11.). Die so, neben den schon identifizierten $tRNA^{Glu}3$-Genen, nachgewiesenen zusätzlichen tRNA-Gene wurden ebenfalls als BamHI oder HindIII Fragmente in den Plasmidvektor pBR322 subkloniert und kartiert.

Im folgenden werden die Restriktonskarten der auf diese Weise bearbeiteden Cosmidklone und ihrer Plasmid-Subklone vorgestellt.

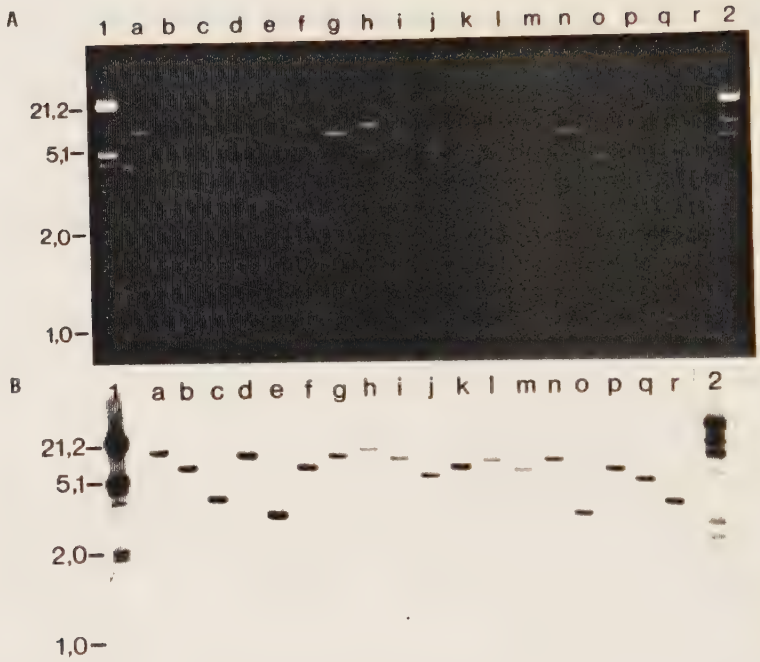

Abbildung 5: Restriktionskartierungsgel und Hybridisierung des entsprechenden Nitrozellulosefilter des Subklones pYH98-2 mit ^{125}I-markierter Gesamt-tRNA aus Hefe.

Abbildung 5-A: je 0,2 µg pYH98-2 DNA wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisiert.
Restriktionsspaltungen: a: BamHI; b: BamHI x ClaI; c: BamHI x EcoRI; d: BamHI x HindIII; e: BamHI x PstI; f: BamHI x PvuII; g: BamHI x SalI; h: ClaI; i: ClaI x EcoRI; j: ClaI x HindIII; k: ClaI x PstI; l: ClaI x PvuII; m: ClaI x SalI; n: EcoRI; o: EcoRI x HindIII; p: EcoRI x PstI; q: EcoRI x PvuII; r: EcoRI x SalI.
Als DNA-Markerfragmente wurde λ-DNA gespalten mit EcoRI x HindIII (1) bzw. mit HindIII (2) aufgetragen. Fragmentgrößen sind in kb angegeben.
Abbildung 5-B: Hybridisierungsanalyse des entsprechenden Nitrozellulosfilters mit radioaktiv markierter Gesamt-tRNA aus Hefe. Die DNA-Markerfragmente wurden durch eine anschließende Hybridisierung mit markierter λ-DNA sichtbar gemacht.

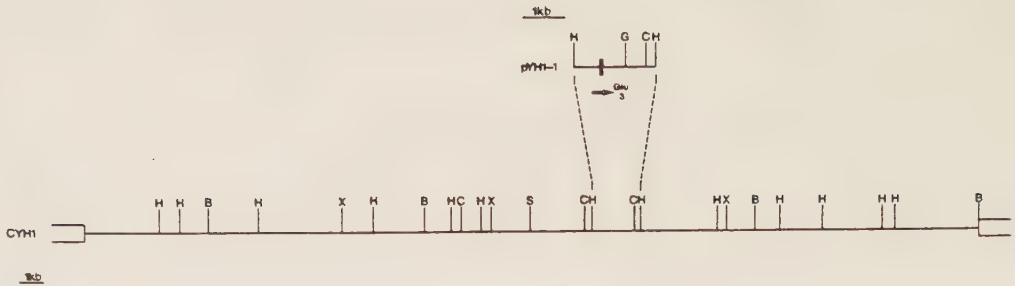

Abbildung 6: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH1 und seines Subklones pYH1-1.

Restriktionsspaltstellen: B: BamHI; C: ClaI; G: BglII; H: HindIII; S: SalI; X: XhoI. Das tRNA-Gen ist in Form eines schwarzen Rechteckes eingezeichnet. Die 5'-3' Transkriptionsrichtung des Genes ist angegeben. Cosmid-Vektoranteile sind als offene Rechtecke dargestellt.

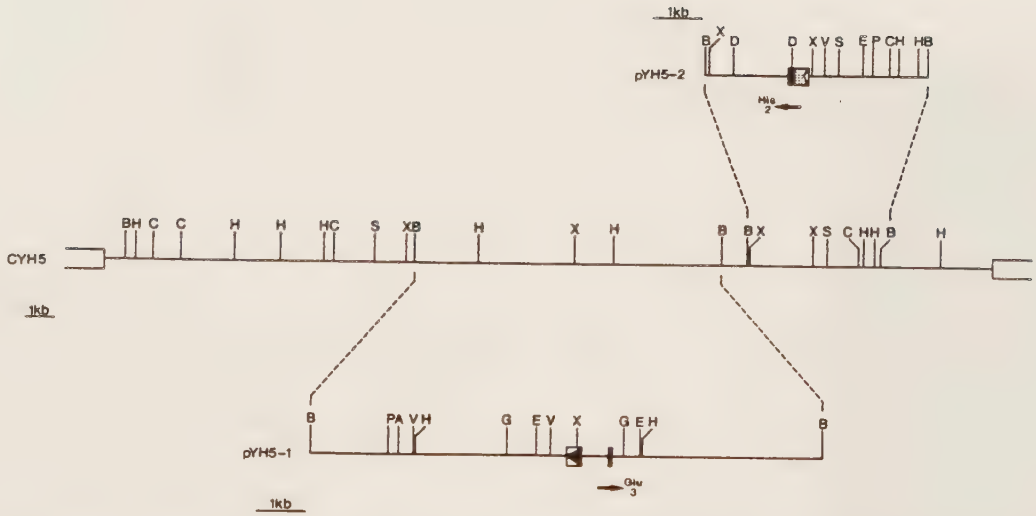

Abbildung 7: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH5 und seiner Subklone pYH5-1 und pYH5-2.

Restriktionsspaltstellen: A: XbaI; B: BamHI; C: ClaI; D: HaeIII; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; P: PstI; S: SalI; V: PvuII; X: XhoI.
Die tRNA-Gene sind in Form von schwarzen Rechtecken angegeben. Ein schwarzer Pfeil in einem Rechteck markiert das Delta-Element. ein punktiertes Rechteck das Sigma-Element. Die 5'-3' Transkriptionsrichtung der Gene und Elemente sind immer durch Pfeile angezeigt. Cosmid-Vektoranteile sind als offene Rechtecke dargestellt.

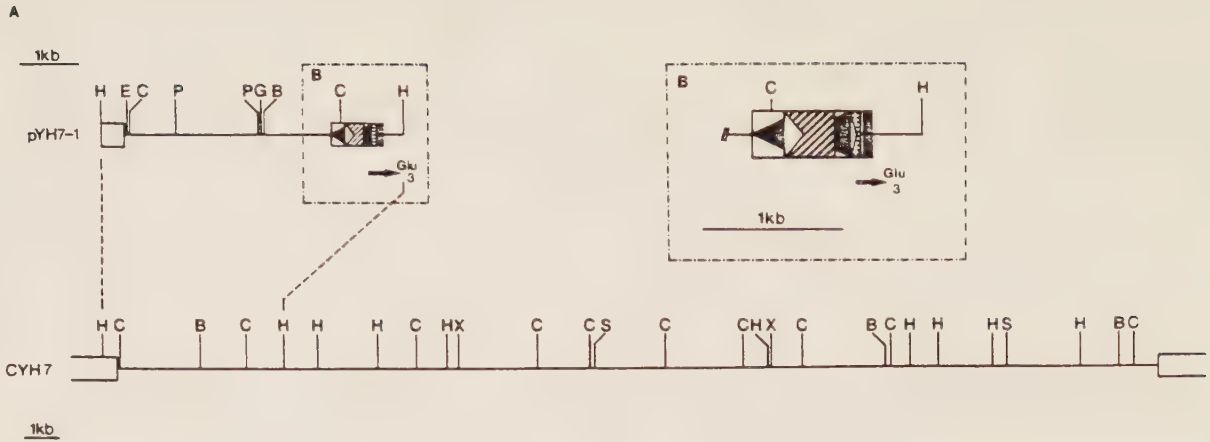

Abbildung 8a: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH7 und seines Subklones pYH7-1.

Restriktionsspaltstellen: B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; P: PstI; S: SalI; X: XhoI.
Cosmid-Vektoranteile sind als offene Rechtecke dargestellt.

Abbildung 8b: Teilausschnitt des tRNA-Genbereiches mit dem durch multiple Elementinsertion bedingten komplexen genomischen Organisationsmuster.

Das tRNA-Gen ist in Form eines schwarzen Rechteckes angegeben. Ein schwarzer Pfeil in einem Rechteck symbolisert das Delta-Element, das in diesem Fall durch ein komplettes Tau-Element, schraffiert dargestellt, unterbrochen ist. Die Reste eines Sigma-Elementes sind punktiert dargestellt. Die 5'-3' Transkriptionsrichtung der Gene bzw. Elemente sind immer durch Pfeile angezeigt.

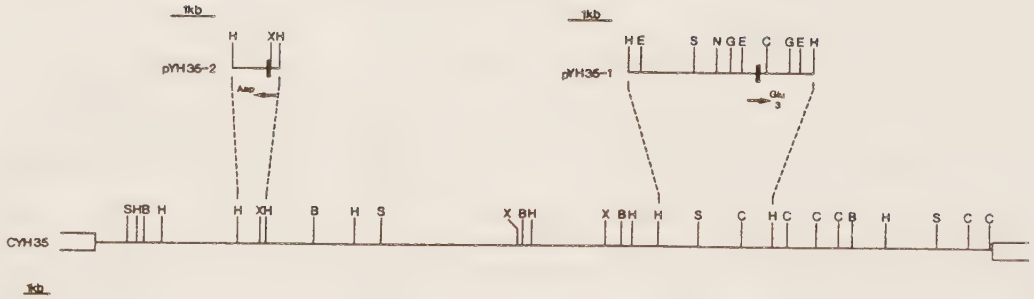

Abbildung 9: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH35 und seiner Subklone pYH35-1 und pYH35-2.

Restriktionsspaltstellen: B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; N: SacI; S: SalI; X: XhoI.
Die tRNA-Gene sind in Form von schwarzen Rechtecken angegeben. Ihre 5'-3' Transkriptionsrichtung wird durch Pfeile markiert. Offene Rechtecke symbolisieren Cosmid-Vektoranteile.

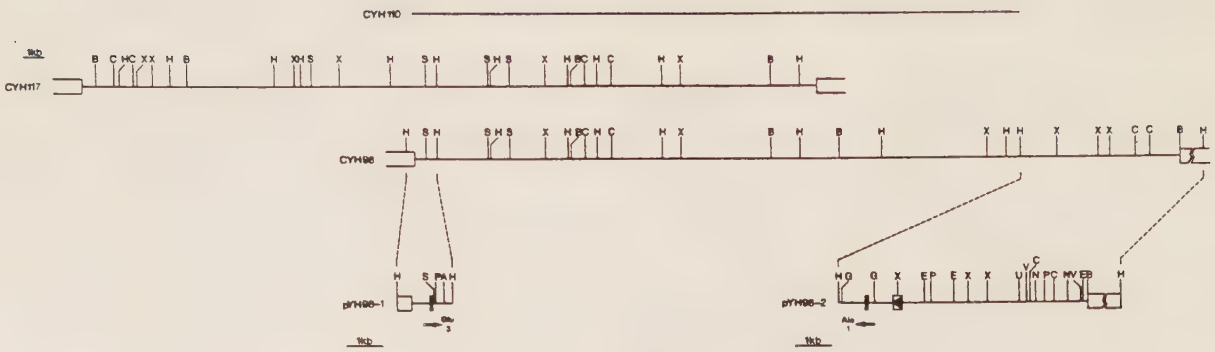

Abbildung 10: Physikalische Karte der überlappenden Cosmidklone CYH98, CYH117 und der Subklone pYH98-1 und pYH98-2.

Restriktionsspaltstellen: A: XbaI; B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; N: SacI; P: PstI; S: SalI; U: StuI; V: PvuII; X: XhoI.
Die Lage der tRNA-Gene wird durch schwarze Rechtecke markiert. Ein schwarzer Pfeil in einem Rechteck zeigt ein Delta-Element an. Die 5'-3' Transkriptionsrichtung der Gene bzw. des Elementes wird durch Pfeile angegeben. Die Lage des mit diesem genetischen Bereich vollkommen überlappenden Cosmidklones CYH110 ist angezeigt.

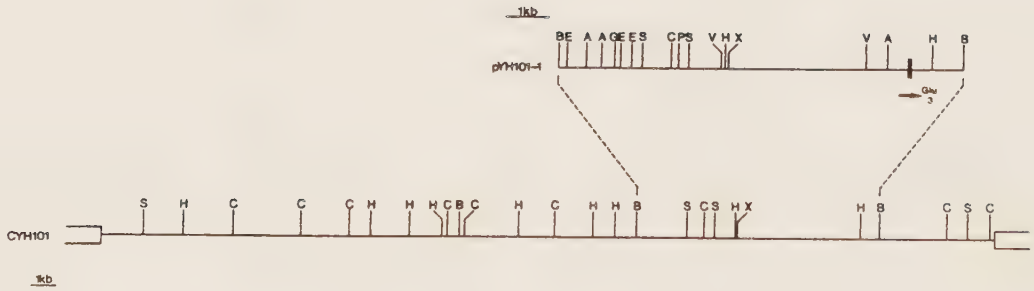

Abbildung 11: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH101 und seines Subklones pYH101-1.

Restriktionsspaltstellen: A: XbaI; B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; P: PstI; S: SalI; V: PvuII, X: XhoI.
Das tRNA-Gen ist in Form eines schwarzen Rechteckes angegeben; seine 5'-3' Transkriptionsrichtung markiert ein Pfeil. Cosmid-Vektoranteile werden durch offene Rechtecke symbolisert.

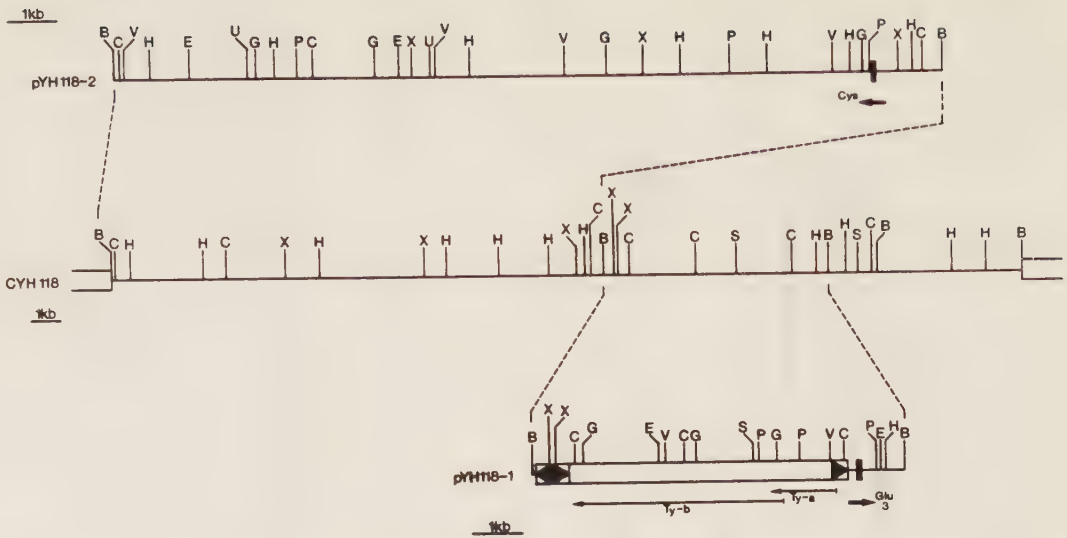

Abbildung 12: Physikalische Karte des Cosmidklones CYH118 und seiner Subklone pYH118-1 und pYH118-2.

Restriktionsspaltstellen: B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; P: PstI; S: SalI; U: StuI; V: PvuII; X: XhoI.
Die tRNA-Gene sind als schwarze Rechtecke, Delta-Elemente als schwarze Pfeile in Rechtecken dargestellt. Die internen Ty-Sequenzen (Epsilon-Sequenzen) werden durch ein geschlossenes Rechteck angezeigt. Die beiden Leserahmen im Ty (Ty-a, Ty-b) sind angegeben. Die Orientierung der Gene bzw. Elemente wird immer durch Pfeile markiert.

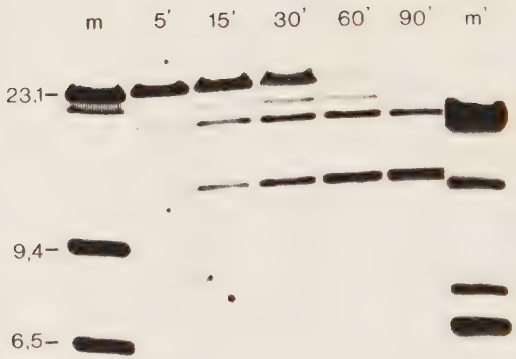

Abbildung 13: Beispiel einer schnellen Restriktionsanalyse nach Lehrach (79) anhand des Cosmides CYH101.

20 µg CYH101-DNA wurden mit dem selbsthergestellten Terminase-extrakt an der cos-Stelle des Cosmides linearisiert. Diese DNA wurde daraufhin einem partiellen Restriktionsverdau mit der Nuklease BamHI unterworfen. Zu den Zeitpunkten 5, 15, 30, 60 und 90 Minuten wurde die Inkubation durch Phenolzugaben beendet und mit Ethanol präzipitiert. Die DNA dieser verschiedenen Zeitwerte wurden daraufhin mit dem der linken cos-Stelle komplementären Oligonukleotid (ON-L), welches zuvor 5'-endmarkiert wurde, hybridisert und auf einem 0,5% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Trocknen dieses Geles wurde von ihm eine Autoradiographie angefertigt die hier gezeigt ist. Als DNA-Markerfragmente diente 5'-endmarkierte DNA des Phagen λ gespalten mit den Nukleasen HindIII (m) und StuI (m').

Tabelle 1: Charakteristika der bearbeiteten Klone

Cosmid	Größe* (kb)	Subklon	Größe* (kb)	tRNA-Gene	assoziierte Elemente
CYH1	36,2	pYH1-1	2,0	Glu_3	-
CYH5	30,4	pYH5-1	10,5	Glu_3	Delta
		pYH5-2	4,6	His_2	Sigma
CYH7	29,6	pYH7-1	4,8	Glu_3	Delta, Tau, Sigma (Sigma verstümmelt)
CYH35	33,9	pYH35-1	4,2	Glu_3	-
		pYH35-2	1,1	Asp	-
CYH98/ 117	50,3	pYH98-1	1,0	Glu_3	-
		pYH98-2	7,4	Ala_1	Delta
CYH101	34,8	pYH101-1	9,4	Glu_3	-
CYH118	30,3	pYH118-1	7,4	Glu_3	Ty
		pYH118-2	16,5	Cys	Ty, Delta

* Vektoranteile sind nicht berücksichtigt.

2.4. DNA-Sequenzanalyse der tRNA-Gene

Die DNA-Sequenz der bei der Bearbeitung der Cosmide und ihrer Subklone durch Hybridisierungsexperimente nachgewiesenen und isolierten tRNA-Gene wurde mit Hilfe der "Didesoxy-Kettenabbruch"-Methode (76) bestimmt. Dazu wurden geeignete DNA-Subklone im M13 Phagen-System (81) subkloniert. Die genaue Lage und Orientierung der tRNA-Gene konnte in Bezug auf eine bestimmte Restriktionsstelle auf diese Weise bestimmt werden.

Zur Bestimmung ihrer genauen Lokalisierung und Orientierung wurde von sämtlichen ebenfalls durch Hybridisierungsexperimente identifizierten repetitiven Elementen, so weit erforderlich, Teilsequenzen erstellt.

Im folgenden werden die für die tRNA-Gene ermittelten DNA-Sequenzen vorgestellt (Abb. 14-16). Die Abbildungen zeigen jeweils die Sequenz desjenigen DNA-Stranges, welcher dem Primärtranskript entspricht.

CYH1

Glu3→

CGTTTCAATTTTCTAATCCTTGTAATCCGATATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTTT 100

TCATTATTATTTTTAATCTAGCAGTACTAGCGTGATGTTAATGTTACTCATTTTATTTTGTTGAATCATTATGGTGCAGTACTTTTCCATAGATATGTAT 200

TTCATATGCGCTTTTCGTCCTAAACTACAGGATGTTAATCGTTGAATATGTATATGTTGATGCCACGTAAATAATATGTGTCTTCTTTTTGCATCGCTGT 300

CATTAAACGCGAAAAAAAACTTTGAAAGGTAAAAAGAAACCGTTCTTTACTATATATTCAACAACCCATCTTCGACCAAAGCATTGAAGAGCCTTAGGAC 400

TCATACAACTGAAATCTGTAAAAAATGTGGAACAAAACCAGAACGACGCTTCTGGCTGTTGGTGTCTTATTTCATTTATTTTACCTATGGTCTATTTTTG 500

ATATCTATTTCATTTCACCGCTTGTTCATGGTATGAGCCATATAAAGTACTCCAACCCCTCCTGCAAAGAGATTGTTTTTGATTGTCGGTGATGGTTTAC 600

GTGCAGATACCACTTTTGATAAAGTCACTCATCAGTATCCGGAAAAACAGAATTTCTGGCGCCTTTTATTAG 672

CYH5

Glu3→

AACAATTATTGTCCGATATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTTTTTGTCTAAGTTGAG 100

AAAGTTTTTTCCAGTTAAGTTATTATGACGCATGCACATAGAAGGATCACCGAACAAAGTTGCAATTATTAGGCACCGAATGAAGAAAATGAGAACCTAA 200

TTTCGCTTGGCATAGTAAAAACTGGTTTTATCTGCATCGAAAAAGTTATATAGATTTATGCCTCATATATAAAATAGAATTTTAGAATAAGATAATCCTT 300

ATTTATTTTCGAGATC 316

CYH7

Glu3→

TGACGTATTCCATTTTGAGATGCAACACATACGTGTATTGTAATCCGATATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGGAGACCGGGGTTCGA 100

CTCCCCGTATCGGAGTACTTTTTTGACACCATACAGTGTATGTATGGTGTTAGGAGCCACCTTCCAACAAAGCATCACGCTGTCGTATCTCAATTGTCCT 200

CYH35

Glu3→

ATTTCACAGATTACCATCCGATATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTGTTCTTTTTCTT 100

ACCTCTTGAAAAAGAGGTAGTAAAGTCAATATAAATTCTTGGCTGAAGTATTTCAATACAATTGTCAAGAAGTTATTATTTTTTAATGACTTATATCTG 200

TCCAACACAACAGGTTACACCATATAATCTCTATTTACTGGACAGCGAAATCA 253

Abbildung 14: DNA-Sequenzen der tRNA^{Glu}3-Loci die in den Cosmiden CYH1, CYH5, CYH7 und CYH35 repräsentiert sind.

Die tRNA-Gene sind durch horizontale Linien eingezeichnet. Ihre 5'-3' Orientierung wird jeweils durch einen Pfeil angegeben. Die Sequenzanalyse des tRNA-Genes von Klon CYH7 wurde von R. Stucka (persönliche Mitteilung) durchgeführt.

CYH98

Glu3 →

AAAAATAGAACAATTGATATTGATCGTTTCTTTAATAACTCGATAAGAAGTCCTAGCCGCAAGAATATAACAGCGTAAATATAATCCGATATAGTGTAAC 100

GGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTCTTCTTTTTGAAGAAATTTGAAAATTTTTTTCTTCAC 193

CYH101

GGTTAGCGCTGCGGCGTTGCACAGGGCATGAAACTAGGAAAACGTACTTTGGGGCCGATTGTAAAAAAAATTCTATCAAAACAACTAGTACAGAACAGTT 100

Glu3 →

GAGTTTAGAGCCGTGTCTATTATCATATGGAAAGATGATTCTCTTGTTAATTTGGTAAGTAGTACTATTAGTGTTGAATATTAGTCGCTTATAATCCGA 200

TATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCACCGTGGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTCTTTTTTTATGTGATTAGCTAAATAGTTATTT 300

TTTGAAGTAGTTTGTAGTAGTTCACCTTTATCCTATTAAAATATAATATCACACGAAAATTATCTGTTTGTCCTAATTCAGTTTGATCATTGTGCTAGAT 400

GTTCAATATTGTGAAACTTTTACAATACCGATTCGGTGCGGACATTCTTGAAAATACAATACCGTGCGATCGCTTTAAATTTTTTTGAGGCATGAGCGTA 500

AATAGACTGG 510

CYH118

Glu3 →

TTATTATCCGATATAGTGTAACGGCTATCACATCACGCTTTCAGCCTGGAGACCGGGGTTCGACTCCCCGTATCGGAGTTATTTTTTGTTTCTATACCAT 100

TATTTTTCGTAAAGGTGTCGATATGATAGTATAGTTTGCTATACAAACTCAACTCTAAAACACAGTAGCTCTAGCTCTACTACTCTCTCTAATCAAAATC 200

GTCACTCTATCAAAGCTGTGATAATTTGGAAATATTAGGTCTGGGCCACGAATGATTTTTCAATTACATTGCTAAATACGAAGACATTAATACCTTTATT 300

CATATAAGCACTTTCTTATCATTTTTTACTAAAGATAAAACTAA 344

Abbildung 15: DNA-Sequenzen der $tRNA^{Glu}3$-Loci die in den Cosmiden CYH98, CYH101 und CYH118 repräsentiert sind.

Die tRNA-Gene sind durch horizontale Linien eingezeichnet. Ihre 5'-3' Orientierung wird jeweils durch einen Pfeil angegeben.

CYH5

GACCGGAATCTCGGATCTAAACTAATGTCAGGCATTTATACTTTTGGTAGTCAGCTAGGGAAGGACGGGTTTTATCTCATGTTGTTCGTTTTGTTATAAG 100

Hla2 →

GTTGTTTCATATGTGTTTTATGAACGTTTAGGATGACGTATTGTCATACTGACATATCTCATTTTGAGATACAACAAAGTTCATAAAGAAATTAGCCATC 200

TTAGTATAGTGGTTAGTACACATCGTTGTGGCCGATGAAACCCTGGTTCGATTCTAGGAGATGGCCATTTTTTCCGAAATTTCGCCTTCTCGCACAACTT 300

TCCAAACCCGACCAAGAGAAGGAAGAAATCATTTTTTTGTTGCGAGTTGTCATAGAACGAGGTCGAGAAACAGAAGAGGATTGAAAATGAATTGTAAAA 400

GCGTTCGTTCTATGCTTAATAAGGGTACGCTTCTTGATGTGACCAAATGCCAAAACATGAGATTTC 464

CYH35

Asp →

GTTACTTCCGTGATAGTTTAATGGTCAGAATGGGCGCTTGTCGTGCCAGATCGGGGTTCAATTCCCGTCGCGGAGATATTTTTTATCATCACAAAAATAA 100

GATAGCAAAACTGAAGAAACGATGAGTTAGTTTTAACTTTTAAAAGATCGTCCAATATTAACATAAAGGAACCCAGTTCTTTGGAAATAACAGGAAAGTG 200

CAGAAGTTCATTAGAATCACAGTGATCTGATATCAATATATATATATATATATATATATATATATATAGGTTA 271

CYH98

Ala1 →

ACATGTCTTCAAATTGGTTTCATTAATAAAAGTTTAAAAATGTATCCTACATTTATGTTTTCTATACTTCTTCAAAGTCTTCAATACAAATCGGGCGTGT 100

GGCGTAGTCGGTAGCGCGCTCCCTTAGCATGGGAGAGGTCTCCGGTTCGATTCCGGACTCGTCCATTTTTTATTTTTTTTGGCTAACTAACCCATATATA 200

ACGTCTTTTACGAGGTTACATGAGATACAGCATATTCCATAGA 243

CYH118

Cys →

ATATGTGGGGCTGGGCATCATTCGTATATTGACTATACTATCTATATTAGTCTTCCCACATGTAATAGAAAGCTCGTATGGCGCAGTGGTAGCGCAGCAG 100

ATTGCAAATCTGTTGGTCCTTAGTTCGATCCTGAGTGCGAGCTTCTTTTTTTTTTGCAATCCTTATTGAACTTTTTTTCTTGCTGCAC 188

Abbildung 16: DNA-Sequenzen von tRNA-Genen der Cosmide CYH5, CYH35, CYH98 und CYH118 die nicht der $tRNA^{Glu}$3-Genfamilie zugehörig sind.

Die tRNA-Gene sind durch horizontale Linien eingezeichnet. Ihre 5'-3' Orientierung wird jeweils durch einen Pfeil angegeben.

Tabelle 2: Sequenzierungs-Subklone der analysierten Cosmidklone

Cosmid	Sequenz. -Klon	Fragmentenden 5'	3'	Größe (bp)	M13 Vektor	Klonierungs-stellen*
CYH1	1-1	H	G	1100	mp10	H x B
CYH1	1-2	G	H	1100	mp11	H x B
CYH1	1-3	L	H	610	mp8	Z (K)
CYH1	1-4	L	G	590	mp8	Z (K)
CYH5	5-1	X	V	600	mp10	S x A (K)
CYH5	5-2	X	G	800	mp8	S x B
CYH5	5-3	G	X	800	mp9	S x B
CYH5	5-4	G	X	400	mp11	B x S
CYH5	5-5	G	E	1200	mp10	B x E
CYH5	5-6	E	G	1200	mp11	B x E
CYH5	5-7	X	E	800	mp10	S x E
CYH5	5-8	D	X	300	mp11	Z x S
CYH5	5-9	D	D	1000	mp8	Z
CYH7	7-1	H	C	1100	mp10	H x B (K)
CYH7	7-2	C	H	1100	mp11	H x B (K)
CYH35	35-1	C	E	580	mp10	B x E (K)
CYH35	35-2	E	C	580	mp11	B x E (K)
CYH35	35-3	H	X	240	mp10	H x S
CYH35	35-4	X	H	240	mp11	H x S
CYH35	35-5	H	X	690	mp10	H x S
CYH35	35-6	X	H	690	mp11	H x S
CYH98	98-1	S	H	800	mp11	S x H
CYH98	98-2	X	G	600	mp8	S x B
CYH98	98-3	G	X	600	mp9	S x B
CYH98	98-4	G	G	850	mp8	B
CYH98	98-5	H	E	2600	mp10	H x E
CYH101	101-1	H	A	1100	mp10	H x A
CYH101	101-2	A	H	1100	mp11	H x A
CYH101	101-3	T	X	600	mp8	Z (K)
CYH101	101-4	T	H	500	mp9	Z x H (K)
CYH118	118-1	P	C	600	mp10	P x B (K)
CYH118	118-2	C	P	600	mp11	P x B (K)
CYH118	118-3	S	E	1900	mp10	S x E
CYH118	118-4	X	H	250	mp11	S x H
CYH118	118-5	P	X	550	mp10	P x S
CYH118	118-6	X	P	550	mp11	P x S

*K steht für mit Klenow-Polymerase aufgefüllte Restriktionsenden

Restriktionsendonukleasen: A: XbaI; B: BamHI; C: ClaI; D: HaeIII; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; L: HpaII; P: PstI; S: SalI; T: TaqI; V: PvuII; X: XhoI; Z: SmaI.

2.5. Untersuchungen der allelischen Situationen bei Ty-Insertionen in der Nachbarschaft von tRNA-Genen

Die Verwendung des diploiden Hefestammes C836 bei der Konstruktion der Cosmidgenbank erlaubt es allelische Situationen zu erfassen. Die Insertion eines repetitiven Elementes kann auf beiden oder nur einem spezifischen Allel erfolgt sein. Durch die Isolierung dieser, durch eine Elementinsertion hervorgerufenen, Allele aus der Genbank ist der direkte Vergleich in Expressionstudien möglich. Die Allele selbst lassen sich durch Sporulation des diploiden Hefestammes in Haplonten trennen und untersuchen.

Die Untersuchung der Allelbildung durch unterschiedliche Insertionsereignisse von Elementen konzentrierte sich im vorliegenden Fall auf die Integration von Ty-Elementen, welche mit einer Größe von 5,9 kb einen komplexen retrovirusähnlichen Aufbau zeigen (53,60). Die Aufmerksamkeit auf diese Elementklasse wurde gelenkt durch die komplette Sequenzanalyse eines Ty-Elementes, an welcher der Autor parallel zu dieser Arbeit beteiligt war (47). Dieses Ty-Element befindet sich in der Nachbarschaft eines tRNA-Genes ($tRNA^{Lys}1$) und ist auf dem Klon pY109 lokalisiert. Er wurde als ein 11,4 kb HindIII-Fragment im Plasmidvektor pBR322 isoliert. Die physikalische Karte von pY109 ist in Abbildung 19 dargestellt. Neben dem $tRNA^{Lys}1$-Gen trägt dieser Klon ein einzelnes Delta-Element (solo-Delta) stromaufwärts, d.h. auf der 5'-Seite, und das Ty-Element stromabwärts, d.h. auf der 3'-Seite, des tRNA-Genes. Die allelische Situation wurde untersucht, indem ein Nitrozellulosefilter mit verschiedenen geeigneten Restriktionsspaltungen genomischer C836-DNA mit dem singulären 0,75 kb HindIII x EcoRI DNA-Fragment aus pY109 hybridisiert wurde (Abb. 17).
Das Hybridisierungsmuster erlaubte die Interpretation, daß im Gegensatz zu dem Allel, welches durch den Klon pY109 repräsentiert wird, das andere Allel keine Ty-Insertion trägt.

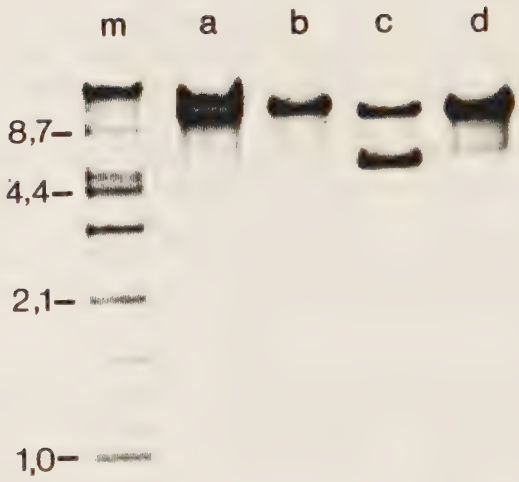

Abbildung 17: Filterhybridisierungsanalyse genomischer C836-DNA zum Nachweis der heterozygoten Ty-Insertion im durch den Klon pY109 repräsentierten Locus.

Je 10 µg C836-DNA wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI (a), EcoRI (b), HindIII (c) und PstI (d) gespalten, elektrophoretisiert und auf einen Nitrozellulosefilter transferiert. Dieser Filter wurde hier mit dem singulären 0,75 kb HindIII x EcoRI DNA-Fragment aus pY109 hybridisiert.
Als Hybridisierungsmarker (m) diente hier eine Mischung aus ligierter linearer pBR322 Plasmid-DNA und verschiedenen Restriktionsverdauungen dieser DNA (BamHI x PstI; RsaI; EcoRI x HinfI). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Das einzelne Delta-Element (solo-Delta), welches stromaufwärts (5'-Seite) des $tRNA^{Lys}1$-Genes liegt, ist in beiden Allelen vorhanden. Im Falle von BamHI und HindIII stellen die größeren Banden das Ty^{+}-Allel, die kürzeren Banden das Ty^{-}-Allel dar. Bei der Spaltung mit der Restriktionsendonuklease EcoRI ist nur eine Bande zu sehen, da die DNA-Probe mit einem Fragment hybridisiert, welches teilweise außerhalb des in pY109 klonierten Bereiches liegt. Die zwei hybridisierenden PstI-Fragmente von etwa gleicher Größe, welche als hybridisierende Doppelbande zu erkennen sind, stammen von den beiden Allelen: das größere ist begrenzt durch die PstI-Stelle innerhalb des Ty-Elementes und eine PstI-Stelle außerhalb des klonierten Bereiches. Das 300 bp kleinere Fragment ist begrenzt durch die PstI-Stelle im Ty^{-}-Allel (vgl. Abb.19) und die gleiche PstI-Stelle außerhalb des klonierten Bereiches. Es handelt sich demnach um ein heterozygotes Ty-Insertionsereignis.

Das Ty^{-}-Allel wurde nun mit Hilfe der singulären 0,75 kb HindIII x EcoRI DNA-Probe aus der Cosmid-Genbank isoliert und als 5,3 kb HindIII-Fragment in pBR322 subkloniert. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung pYH22 (Abb. 19).

Das Gegenteil, nämlich eine homozygote Ty-Insertion, stellt der in Klon CYH118 repräsentierte Fall dar. In diesem Cosmid ist ein Ty-Element auf seinen beiden Seiten, mit je einem $tRNA^{Glu}3$-Gen bzw. $tRNA^{Cys}$-Gen, vergesellschaftet. Die Filterhybridisierungsanalyse genomischer C836-DNA wurde hier mit der spezifischen singulären DNA-Probe, dem 500 bp BamHI x HindIII Fragment aus dem Plasmidklon pYH118-1, durchgeführt. Die Wahl der verwendeten Restriktionsendonukleasen richtete sich direkt nach der CYH118-Restriktionskarte (vgl. Abb. 12). Bei der Existenz verschiedener Allele, bedingt durch eine heterozygote Ty-Insertion, müßte eine Fragmentdifferenz von 5,9 kb deutlich sichtbar werden. Dies war nicht der Fall (Abb. 18), also handelt es sich hier um ein homozygotes Ty-Insertionsereignis.

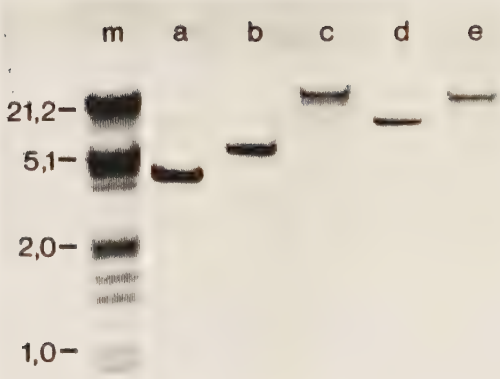

Abbildung 18: Gesamt-DNA-Hybridisierungsanalyse genomischer C836-DNA zum Nachweis der homozygoten Ty-Insertion im durch den Klon CYH118 repräsentierten Locus.

Je 10 µg C836-DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen BglII (a), SalI (b), XhoI (c), BamHI (d) und XbaI (e) gespalten und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Der entsprechende, hier vorgestellte, Nitrozellulosefilter wurde mit einer spezifischen singulären DNA-Probe, dem 500 bp BamHI x HindIII Fragment aus pYH118-1, hybridisiert.
λ-DNA (verdaut mit HindIII x EcoRI) wurde als Längenstandard (m) verwendet; eine Hybridisierung mit radioaktiv markierter λ-DNA machte die Fragmente sichtbar. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

2.6. Expressionsstudien am Beispiel eines $tRNA^{Lys}1$-Gens

2.6.1. Konstruktion der Oozyten-Mikroinjektionsklone

Der Klon pY109 bietet sich ideal als Ausgangspunkt für tRNA-Expressionsstudien an. In dieser Arbeit wurde das bewährte System der Mikroinjektion in Xenopus laevis Oozyten zur Untersuchung der tRNA-Expression angewandt. Das Vorliegen der kompletten Ty-Sequenz (47) erleichtert die Konstruktion verschiedener Mikroinjektionsklone. Die Existenz eines Ty^+/Ty^--Allelpaares (pY109/pYH22) schafft zudem vergleichbare Wildtypsituationen.
Ausgehend von der Beobachtung, daß das Ty^+-Allel eine viel stärkere tRNA-Genexpression aufwies als das Ty^--Allel, sollte eine Reihe von Varianten konstruiert werden. Durch die Entfernung bzw. Umordnung verschiedener Ty-Bestandteile in diesen Varianten sollte es möglich sein, die Stimulierung der tRNA-Genexpression einem definierten Strukturteil des Klones pY109 (Ty^+-Allel) zuzuordnen. Auf diese Weise wurden die Konstrukte pYH109-1 bis pYH109-7 (Abb. 18) dargestellt. Dazu war es in manchen Fällen der Konstruktion notwendig, modifizierte Versionen der Vektoren pBR322 (77,78) und pUC9 (82) herzustellen: pBR322-PvS ist ein pBR322-Derivat in welchem die SalI- und PvuII-Stelle zerstört wurden. Dazu wurde pBR322 mit SalI x PvuII gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt. Das 2,9 kb Fragment (mit Ampicillinresistenz und Replikationsursprung) wurde aus dem Agarosegel elektroeluiert, die enstandenen Enden mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden umgewandelt und mit T4-DNA-Ligase religiert. Somit war die PvuII-Erkennungsstelle zerstört, während die SalI-Erkennungsstelle restauriert wurde. Eine wiederholte Restriktionsspaltung mit SalI, Klenow-Polymerase-Behandlung und Religierung mit T4-DNA-Ligase zerstörte nun auch diese und führte zu pBR322-PvS.

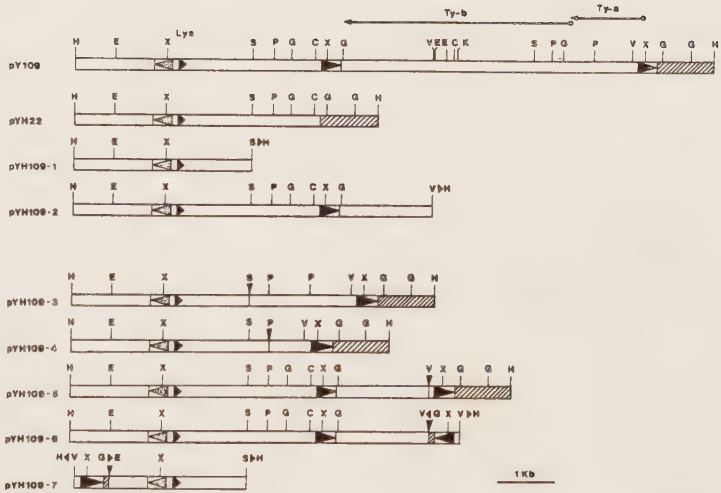

Abbildung 19: Struktur der Hefe-DNA-Insertionen von verschiedenen Plasmiden zur Xenopus laevis Oozyten Mikroinjektion.

Restriktionsspaltstellen: C: ClaI; E: EcoRI; G: BglII; H: HindIII; K: KpnI; P: PstI; S: SalI; V: PvuII; X: XhoI:
Die Orientierung des tRNALys(1)-Genes ist durch einen kurzen Pfeil angegeben. Die größeren Dreiecke markieren die Positionen und Orientierungen der Delta Elemente. Die zwei offenen Leserahmen des Ty-Elementes (Ty-a, Ty-b) sind angezeigt.
Die Plasmide pY109 und pYH22 stellen die Wildtypallele dar. Die Pfeile über bestimmten Restriktionsstellen der Konstruktklone pYH109-1 bis pYH109-7 zeigen Erkennungssequenzen die synthetisch, entweder durch Einsatz von Klenow-Polymerase oder durch Linker-Moleküle, miteinander kombiniert wurden.

pUC9-PS ist ein pUC9-Derivat indem die PstI- und die SalI-Erkennungsstelle zerstört wurde. Die SalI-Stelle wurde analog zur SalI-Stelle in pBR322-PvS durch Spaltung, glatte Enden-Bildung und Religierung zerstört. Die PstI-Stelle durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease PstI, Umwandlung der entstandenen 3'-überhängenden Spaltenden in glatte Enden mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase und Religierung mit T4-DNA-Ligase.

Der Klon **pYH109-1** wurde erhalten, indem das 2,9 kb HindIII x SalI Fragment aus pY109 mit Hilfe von synthetischen HindIII-Linkern in die HindIII-Stelle von pBR322 kloniert wurde. pYH109-1 entspricht somit von seinen Charakteristika her dem Ty^--Allel pYH22.

pYH109-2 wurde auf gleiche Art und Weise als 6,1 kb HindIII x PvuII Fragment subkloniert. Vom Ty-Element blieb hier nur noch das Ende mit dem "Terminator" Delta-Element übrig.

Im Falle von **pYH109-3** wurde das komplette 11,4 kb HindIII Fragment aus pY109 in die HindIII-Stelle von pUC9-PS kloniert. Nach einer Restriktionsspaltung mit dem Enzym SalI, welches ja hier nicht im Vektor schneiden kann, wurde das größere Fragment isoliert und in sich selbst religiert. Diese DNA wurde nun mit HindIII gespalten und lieferte so das gesuchte Fragment, welches in die HindIII-Stelle von pBR322 zurückkloniert wurde. Vom Ty-Element blieb somit nur der Anfang des Ty mit dem "Promotor" Delta-Element übrig. Dadurch wurde dieses Delta-Element an das $tRNA^{Lys}1$-Gen auf einen Abstand von 3,1 kb herangerückt; im Ausgangsklon pY109 ist es 8,0 kb vom $tRNA^{Lys}1$-Gen entfernt.

pYH109-4 wurde auf gleiche Weise wie pYH109-3 konstruiert, nur daß das Zwischenprodukt einer Verdauung mit der Restriktionsendonuklease PstI unterworfen wurde. Das "Promotor" Delta-Element wurde hier, noch näher als in pYH109-3, bis auf 2,4 kb an das $tRNA^{Lys}1$-Gen herangerückt.

Das 3,5 kb PvuII Fragment aus pY109 wurde in **pYH109-5** entfernt, indem das komplette 11,4 kb HindIII Fragment aus pY109 in die HindIII-Stelle von pBR322-PvS ligiert wurde. Nach einer Restrik-

tionsspaltung mit dem Enzym PvuII, welches auch hier wieder nicht im Vektor schneiden kann, wurde das größere Fragment isoliert. Nach der Religierung in sich selbst lieferte wiederum eine HindIII-Spaltung das gesuchte Hefe-DNA-Fragment. Dies wurde wieder in die HindIII-Stelle von pBR322 zurückkloniert. Anfang und Ende, d.h. "Promotor"- und "Terminator"-Delta Element, des Ty blieben in diesem Konstrukt intakt, während die beiden Leserahmen im Ty zerstört wurden.

Für die Konstruktion von **pYH109-6** wurde das 0,59 kb PvuII x BglII Fragment, welches das "Promotor" Delta-Element des Ty-Elementes enthält, in den Phagen M13mp8 (HindII x BamHI) subkloniert. Die Restriktionsspaltung mit HindIII x SmaI und Isolierung dieses Fragmentes führt zum "Promotor" Delta-Element mit korrespondierend ausgetauschten Spaltenden. Dieses DNA-Fragment wurde nun mit dem Zwischenprodukt, welches zur Konstruktion von pYH109-2 benutzt worden war, kombiniert und in pBR322 kloniert. pYH109-6 entspricht somit weitgehend pYH109-5, mit dem Unterschied, daß das "Promotor" Delta-Element in seiner Orientierung umgedreht wurde.

Im Falle von **pYH109-7** wurde das "Promotor" Delta-Element aus dem M13mp8-Subklon durch Restriktionsspaltung mit EcoRI x HindIII gewonnen. Zusammen mit dem 2,21 kb EcoRI x HindIII Segment aus pYH109-1 wurde es in pBR322 zurückkloniert. Hier wurde das "Promotor" Delta-Element des Ty, im Gegensatz zu seiner in situ Position, vor das $tRNA^{Lys}1$-Gen, auf dessen 5'-Seite, gebracht.

Sämtliche Konstrukte wie auch die beiden Wildtyp-Allele (pY109; pYH22) sind in die HindIII-Stelle von pBR322 in der gleichen Orientierung zum Vektor kloniert.

2.7. Expression des $tRNA^{Lys}1$-Genes nach Mikroinjektion der Plasmide in Xenopus Oozyten

Die Wildtypallele (pY109; pYH22) und alle Konstrukte (pYH109-1 bis pYH109-7) wurden mindestens je 3x unabhängig voneinander in Xenopus Oozyten wie in 4.2.18. beschrieben mikroinjiziert. Zusätzlich wurde auch das in den Phagen M13mp8 klonierte "Promotor" Delta-Element, welches für die Konstruktion von pYH109-6 und pYH109-7 benötigt wurde (vgl. 2.5.2.), in einem Kontrollexperiment injiziert. Dieser Klon erhielt die Bezeichnung **prd**.

Die relative Expression des $tRNA^{Lys}1$-Genes in pYH22 wurde $\hat{=}$ 1 und das Expressionsverhalten dieses Genes in den anderen Plasmiden dazu in Bezug gesetzt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Die beiden Wildtyp-Allele zeigen ein stark unterschiedliches Expressionsverhalten des $tRNA^{Lys}1$-Genes. Das Ty^{+}-Allel (pY109) exprimiert das tRNA-Gen ca. 6mal stärker als das Ty^{-}-Allel (pYH22; vgl. Abb. 20B). Auf dieses unterschiedliche Verhalten wird im Diskussionsteil ausführlich eingegangen.

Im Kontrollversuch, wo das "Promotor" Delta-Element allein (prd) in Frosch-Oozyten mikroinjiziert wurde, läßt sich kein Transkript nachweisen (vgl. Abb. 20A). Es zeigt sich deutlich, daß keine endogenen Xenopus-Gene durch dieses Element in ihrer Expression stimuliert werden.

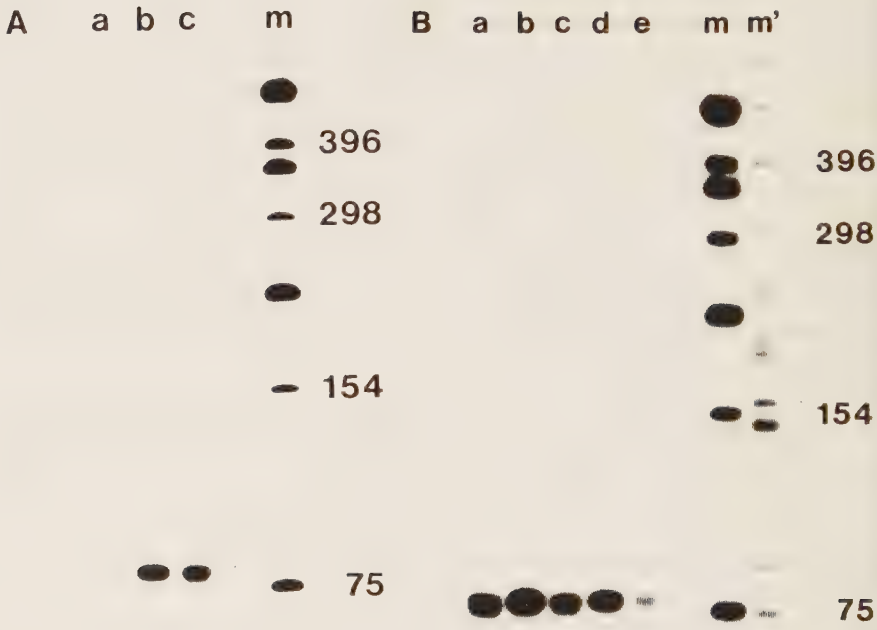

Abbildung 20: Autoradiographie der gelelektrophoretischen Analyse der Transkriptionsprodukte verschiedener Plasmide.

In Abbildung 20-A zeigt Spalte a das Kontrollexperiment mit dem Klon prd. Spalte b das Plasmid pYH109-1 und Spalte c das Plasmid pYH22.
In Abbildung 20-B sind aufgetragen in a: pY109; b: pYH109-4; c: pYH109-6; d: pYH109-7; e: pYH22.
Spalte m zeigt den 5'-endmarkierten Längenmarker pBR322 x HinfI, die Spalte m' den 5'-endmarkierte Längenmarker pBR322 x HpaII. Die Fragmentgrößen sind in bp angegeben.

Tabelle 3: Relative Expressionsraten der Plasmide in der Oozyten-Mikroinjektion und Charakteristika der Konstrukte.

Plasmid	Größe (kb)	Konstrukt-Merkmale	tRNA-Gen	Relative Expression
pY109	15,6	Ty^{+}-Wildtypallel	Lys_1	5,8
pYH22	9,7	Ty^{-}-Wildtypallel	Lys_1	1,0
pYH109-1	7,3	Ty komplett entfernt	Lys_1	1,2
pYH109-2	10,5	5'-Ende des Ty entfernt	Lys_1	1,1
pYH109-3	10,5	3'-Ende des Ty entfernt	Lys_1	3,7
pYH109-4	10,0	3'-Ende des Ty entfernt	Lys_1	15,0
pYH109-5	12,2	Teil des inneren Ty Segmentes entfernt	Lys_1	4,3
pYH109-6	11,2	"Promotor"-Delta umgedreht, Rest des Ty entfernt	Lys_1	3,6
pYH109-7	7,3	"Promotor"-Delta auf andere tRNA-Genseite positioniert	Lys_1	5,2
prd	7,7	"Promotor"-Delta kloniert in M13mp8		0,1

Die Fehlerdifferenz zwischen den einzelnen Klonen aus verschiedenen Versuchsreihen betrug $\pm$ 10%.

3. Diskussion

Der Diskussionsteil folgt im großen und ganzen dem experimentellen Vorgehen. Zum besseren Verständnis der eukaryotischen tRNA-Genexpression werden die darin involvierten konstitutiven Promotor-Strukturelemente vorgestellt. Anschließend wird die molekulare Organisation einer Hefe tRNA-Multigenfamilie beschrieben, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Vergesellschaftung der tRNA-Gene mit repetitiven Elementen gelegt wird. Diese Beschreibung von tRNA-Genen und Elementen innerhalb einer Genfamilie führte direkt zu Expressionsstudien, um die mögliche Funktion solcher Anordnungen zu verstehen. Die Ergebnisse dieser Expressionsstudien werden in Bezug auf den funktionellen Sinn solcher Gen/Elementanordnungen diskutiert.
Nachdem die Konstruktion einer Genbank einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellte, werden zunächst Aussagen über deren Qualität gemacht.

3.1. Güte der Cosmid-Genbank

Hauptkriterium einer Genbank, die ja ein Katalog zufälliger rekombinanter Bakterien- oder Phagenklone darstellt, ist ihre Repräsentativität, d.h. mit welcher Wahrscheinlichkeit sich ein bestimmtes Gen in ihr auffinden läßt. Diese Wahrscheinlichkeit hängt von zwei Parametern ab: zum einen von der Insertionsgröße der klonierten DNA in dem verwendeten Vektorsystem, zum anderen von der Komplexität des Genomes des Organismus, aus welchem die Genbank konstruiert wurde. Es ist einsichtig, daß mit der Zunahme der Genomgröße auch die zu untersuchende Klon-Zahl zunimmt und damit auch die Handhabung der Genbank selbst problematischer wird.

Der Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern und der daraus resultierenden Anzahl von rekombinanten Klonen (N), die untersucht werden müssen um ein Gen mit einer vorher bestimmten Wahrscheinlichkeit (P) aus ihr zu isolieren, wurde von L. Clarke und J. Carbon (83) festgelegt:

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

Wobei f in dieser Gleichung das Größenverhältnis der Insertion zum Gesamtgenom (in kb) darstellt.

Rechnet man die Gleichung, bei einer Größe von $1{,}5 \times 10^4$ kb für das haploide Genom von Saccharomyces cerevisiae durch, kommt man auf eine Zahl von 1200 Klonen (37,5 kb durchschnittliche Insertionsgröße) die zu untersuchen sind, um mit 95% Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Gen daraus zu isolieren (68). Die gleiche Berechnung ergibt bei einer Reduzierung der Insertionsgröße auf 35 kb und einer Anhebung der Wahrscheinlichkeit auf 99% 10600 Klone, welche das gesamte Hefegenom darstellen. Klonzahlen dieser Größenordnung sind beim Absuchen mit verschiedenen Suchproben noch relativ einfach handzuhaben. Die Hefe stellt auch in diesem Fall einen günstigen eukaryotischen Modellorganismus dar.

Da im vorliegenden Fall 200 000 unabhängige Cosmidklone abgesucht wurden (vgl. 2.3.) stellt die konstruierte Genbank mit Sicherheit das Hefegenom repräsentativ dar.

Durch den limitierten Einsatz einer Nuklease mit tetramerer Erkennungssequenz (Sau3A) bei der Herstellung der zu klonierenden Hefe-DNA (Donor-DNA), war die statistische Anwesenheit aller möglichen Hefe-DNA-Fragmente eher gewährleistet als durch Behandlung mit einem Enzym, welches eine hexamere Erkennungssequenz besitzt. Da mit einer völligen statistischen Verteilung dennoch nicht zu rechnen ist, wurde zusätzlich eine sehr kurze Nukleasebehandlung und eine sehr lange Nukleasebehandlung bei der Her-

stellung des Hefe-DNA-Gemisches (vgl. 4.2.2.) mit berücksichtigt. Auf diese Weise sollten auch für das Restriktionsenzym sehr leicht zugängliche, also bevorzugte Erkennungssequenzen, und sehr schwer zugängliche, also vernachlässigte Erkennungssequenzen, an der statistischen Fragment-Gemischbildung mit beteiligt sein.
In der Anfangszeit der Cosmidklonierungstechnik war diese Methode oft mit Problemen behaftet (73). Dazu gehörte das Auftreten von Ligierungsartefakten, indem im Molekül mehrere Vektoranteile auftauchen, daß Vektoranteile mit Donor-DNA-Fragmenten abwechseln, oder daß Donor-DNA-Fragmente in einem Cosmid kloniert sind, welche in situ überhaupt nicht nebeneinander liegen. Diese Probleme wurden durch die Phosphatasebehandlung bestimmter Vektorenden und der Donor-DNA ausgeschlossen (vgl. 4.2.2. und 4.2.3.).

Als vorteilhaft erwiesen sich die positiven Qualitäten der hier vorgestellten Genbank bei Untersuchungen die von P. Nelböck (persönliche Mitteilung) seit geraumer Zeit durchgeführt werden. Dabei soll ein komplettes Hefechromosom mit Hilfe der sogenannten "Chromosomal Walking"-Technik (69-72) kloniert werden. Weder dort noch in dieser Arbeit wurde je ein artefizieller Cosmidklon aus dieser Genbank beobachtet.

3.2. Kontrollregionen für die Transkription von eukaryotischen tRNA-Genen

Die Aktivität verschiedener Gene wird zum großen Teil auf der Ebene der Transkription reguliert, wobei der Transkriptionsinitiation durch die RNA-Polymerase eine zentrale Rolle zukommt. Zu den wichtigsten Strukturbestandteilen eines Gens gehören Promotorbereiche, welche die Erkennung, d.h. die primäre Wechselwirkung der DNA zur Polymerase, bewerkstelligen. Zusätzlich zu diesen konstitutiven Promotorelementen existieren DNA-Bereiche, die mit einer negativen oder positiven Wirkung auf die Transkription korreliert sind (84).

Das Augenmerk wurde bisher hauptsächlich auf die für die Transkription verantwortlichen Kontrollregionen von mRNA kodierenden Genen gerichtet. Die Festlegung und funktionelle Zuordnung dieser Regionen ist relativ weit fortgeschritten.

Zum Beispiel besitzt ein typischer Promotor eines prokaryotischen Gens zwei konservierte Regionen zur Polymeraseerkennung: an Position -10 die sogenannte Pribnow- und an Position -35 die sogenannte -35-Box (84). Weiter flußaufwärts des entsprechenden Gens, und das gilt naturgemäß auch für prokaryotische tRNA-Gene, befinden sich Bindungsstellen für negative oder positive Regulatorproteine (84,85).

Ein typischer eukaryotischer Promotor eines eine mRNA kodierenden Gens zeichnet sich durch die beiden konservierten Promotorelemente TATA-Box (an Position -30) und CAAT-Box (an Position -80) aus. Beide stellen Erkennungssequenzen für die RNA-Polymerase II dar. Die bei der Transkription entstehende mRNA zeigt bei der Deletion der TATA-Box eine starke 5'-Heterogenität. Eine definierte Transkriptionsinitiation ist also nicht mehr gewährleistet. Im genetischen Bereich dieser zwei Elemente liegen im eukaryotischen Organismus oft noch andere Elemente (84). In der Hefe Saccharomyces cerevisiae wurden sogenannte "upstream activating sequences", also definierte Sequenzmotive im 5'-Genbereich, die einen transkriptionsaktivierenden Einfluß ausüben, nachgewiesen (86).

Im Gegensatz dazu zeigen eukaryotische tRNA-Gene eine andere Organisation. Ihre Transkription durch die RNA-Polymerase III hängt, wie in der Einleitung erwähnt, von der Gegenwart zweier intragenischer Promotorbereiche ab. Mehrere Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren, hauptsächlich durch die Einführung von Punktmutationen im tRNA-Gen selbst mit Hilfe der Oligonukleotid-Mutagenese (87), diese internen Promotorbereiche

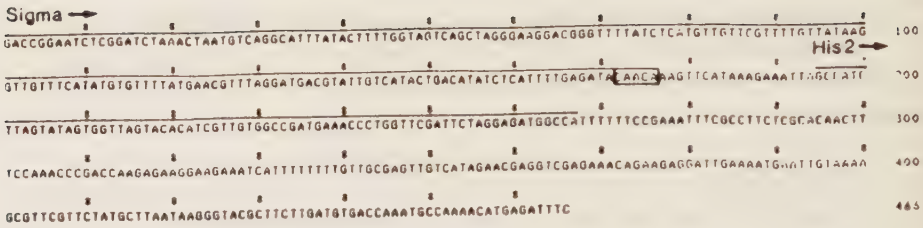

Abbildung 21: DNA-Sequenz des $tRNA^{His}$2-Genes unter besonderer Berücksichtigung des 5'-Genbereiches aus CYH5.

18 bp vor dem Gen ist die 3'-Hälfte eines Sigma-Elementes zu erkennen. Das Sigma-Sequenzmotiv welches nach Raymond et. al. (92) auch Bestandteil einer, die tRNA-Genexpression modulierenden, Konsensussequenz ist (-CAACA-), ist eingerahmt. Die 5'-3' Transkriptionsrichtung des Genes bzw. Elementes ist durch Pfeile angegeben.

auf die Genpositionen 7 - 19 (A-Block im Dihydrouracilarm) und 49 - 61 (B-Block im Pseudouridinarm) festlegen (27-34). Diese räumliche Trennung der beiden Kontrollsegmente durch den Genbereich der Anticodonschleife der tRNA ist Voraussetzung für die Bildung eines stabilen Transkriptionskomplexes (88,89). Dieser Komplex wird gebildet, indem an die konstitutiven intragenischen Promotorelemente drei oder mehr Transkriptionsfaktoren binden, welche wiederum durch die RNA-Polymerase III erkannt werden. Dies wurde sehr schön im Falle des Transktiptionsfaktor TFIIIA, einem 40 kD Protein, und dem 5S RNA-Gen aus Xenopus laevis, das wie die tRNA-Gene durch die RNA-Polymerase III transkribiert wird, gezeigt (90,91).

Würden nun die eukaryotischen tRNA-Gene reguliert exprimiert, und wären gewisse Analogien zu mRNA kodierenden Genen vorhanden, müssen Regulatorelemente in den tRNA-Genflanken vermutet werden. So zeigen neuere Arbeiten, daß auch die, die eukaryotischen tRNA-Gene flankierenden Bereiche, einen modulierenden Einfluß auf die tRNA-Genexpression ausüben (92-94). Besonders deutlich zeig-

ten dies Raymond et. al. (92), die $tRNA^{Leu}3$-Gene aus Saccharomyces cerevisiae untersuchten. Die Autoren finden am 5'-Ende dieser Gene eine konservierte Pentadekanukleotidsequenz (-TTT**CAACA**AATAAGT-), welche in vivo als positiver Modulator auf die tRNA-Genexpression wirkt. Interessanterweise enthält diese Sequenz ein typisches Motiv (-**CAACA**-), welches den repetitiven Hefe-Elementen Delta und Sigma (25,40) ebenfalls zueigen ist (Abb. 21). Hier deutet sich die Möglichkeit an, daß diese, sehr oft mit tRNA-Genen vergesellschafteten, repetitiven Elemente einen Einfluß auf die Expression dieser Gene ausüben. Eine regulierte Genexpression, die in der Hefe möglicherweise über die benachbarten repetitiven Elemente gesteuert wird, müßte angenommen werden.

3.3. Genomische Organisation der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie aus Hefe

Durch die Vergesellschaftung von repetitiven Elementen mit tRNA-Genen in der Hefe kompliziert sich die molekulare Anordnung des genetischen Materiales innerhalb dieser tRNA-Multigenfamilien. Um Struktur/Funktionsbeziehungen nachweisen zu können, und damit Einsicht in den komplexen Ablauf genregulatorischer Vorgänge zu erhalten, ist es mit Hilfe von molekularen Klonierungstechniken möglich, die einzelnen Mitglieder einer tRNA-Multigenfamilie zu isolieren. Man erhält so Zugang zu direkt vergleichbaren Situationen, die dann weitere Untersuchungsmöglichkeiten zur Funktion einer bestimmten genomischen Organisation eröffnen. Bedingung dazu ist, daß die den tRNA-Genen benachbarten Sequenzbereiche, in denen möglicherweise regulatorisch wirksame Elemente lokalisiert sind, ebenfalls mit den assoziierten tRNA-Genen isoliert werden können. Die bisherige Verwendung von Plasmidgenbanken gewährleistete, durch die relative kleine DNA-Insertionsgröße in diesem System, diese Forderung nur bedingt. Mit der Etablierung der in dieser Arbeit vorgestellten Cosmid-Genbank, welche eine mittlere DNA-Insertionsgröße von ca. 35 kb zeigt, wurde dieses Problem umgangen.

Der erste Schwerpunkt dieser Arbeit, die Beschreibung des genetischen Organisationsmusters innerhalb der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie durch die Isolierung und Charakterisierung einzelner Mitglieder in Form von Cosmidklonen, führte zu einer beträchtlichen Erweiterung des Kataloges an $tRNA^{Glu}3$-Genen. Es stehen jetzt 11 unabhängige Mitglieder dieser Multigenfamilie isoliert zur Verfügung. Bei einer durch eigene Hybridisierungsexperimente (nicht gezeigt) angenommenen Gesamtzahl von 10 - 14 Mitgliedern lassen sich erstmals Aussagen über das komplexe Organisationsmuster innerhalb dieser Genfamilie treffen. Zu den sieben im Ergebnisteil vorgestellten Klonen (Abb. 6-12; Abb. 22) gesellen sich noch zwei, aufgrund ihres Restriktionsmusters unterscheidbare Mitglieder dieser Multigenfamilie. Für diese beiden Klone (CYH13 und CYH82) liegen neben der physikalischen Karte Hybridisierungsdaten vor (nicht gezeigt). Aus ihnen läßt sich schließen, daß es im Falle von CYH13 um ein "einsames" $tRNA^{Glu}3$-Gen handelt, während im Falle von CYH82 das $tRNA^{Glu}3$-Gen von einem Delta-Element begleitet wird. Zwei in den Cosmidklonen nicht repräsentierte Plasmidklone von A. Eigel und H. Feldmann zeigen folgende Anordnung: pY20 enthält ein $tRNA^{Glu}3$-Gen assoziiert mit einem Delta und Teilen eines Sigma Elementes, während pY106 neben dem $tRNA^{Glu}3$-Gen ebenfalls ein Delta-Element aufweist (25,75).

Beim Vergleich der in dieser Arbeit vorgestellten Cosmidklone (Abb. 22) und der oben erwähnten Klone CYH13, CYH82, pY20 und pY106, ergibt sich insgesamt folgendes Bild. Von den kloniert zur Verfügung stehenden $tRNA^{Glu}3$-Loci beinhalten fünf (CYH1, CYH35, CYH98/117, CYH101, CYH13) ein $tRNA^{Glu}3$-Gen ohne ein begleitendes repetitives Element. In den anderen gezeigten Fällen befinden sich die Elemente immer auf der 5'-Seite des betreffenden Genes, welche ja oft einen für die Regulation der Genexpression wichtigen Sequenzbereich darstellt (vgl. 3.2.). Interessanterweise zeigen von vier anderen auf den Cosmiden lokalisierten tRNA-Genen drei ebenfalls die Nachbarschaft von Elementen auf ihrer 5'-Seite: $tRNA^{His}2$/Sigma in CYH5, $tRNA^{Ala}1$/Delta in CYH98 und $tRNA^{Cys}$/Delta, Ty in CYH118 (Abb. 22 und Tabelle 1).

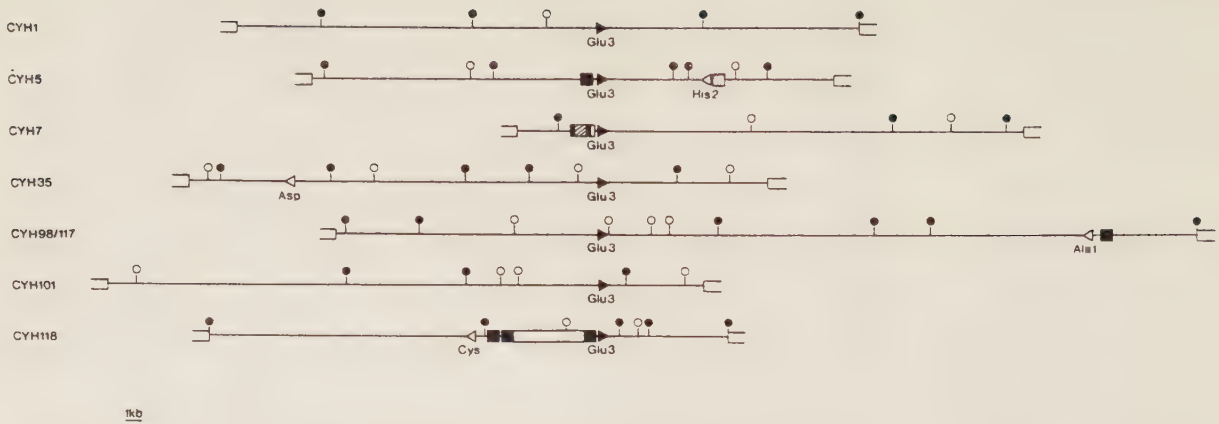

Abbildung 22: Übersichtsdarstellung der bearbeiteten $tRNA^{Glu}$3-Loci und ihres genomischen Umfeldes.

Die tRNA-Gene sind als Dreiecke dargestellt die zugleich ihre 5'-3' Orientierung markieren. Die Position von Delta-Elementen sind in Form von schwarzen Rechtecken, die von Sigma-Sequenzen in Form von punktierten Rechtecken, und die von Tau-Elementen in Form von schraffierten Rechtecken, angegeben. Das innere Ty-Segment im Klon CYH118 ist als geschlossenes Rechteck dargestellt. Cosmid-Vektoranteile sind als offene Rechtecke angedeutet. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die tRNA(Glu)3-Loci untereinander angeordnet und die Nukleaseerkennungsstellen für die Enzyme BamHI (●) und SalI (○) abgebildet.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Vergesellschaftung von tRNA-Genen mit repetitiven Elementen kein Zufall, sondern ein allgemeingültiges Prinzip in der Hefe darstellt. In der "gezielten" Insertion dieser Elemente auf der 5'-tRNA-Genseite ist möglicherweise ein funktioneller Aspekt zu sehen, der auf die tRNA-Genexpression Einfluß nimmt. Die genomische Strukturbeschreibung dieser Anordnungen bietet Ansätze, um die Entstehung solcher "Muster" verstehen zu können.

Ein Augenmerk sei noch auf die Verteilung der isolierten tRNA-Gene gelenkt. Bei einer haploiden Genomgröße von $1{,}5 \times 10^4$ kb in Saccharomyces cerevisiae, und einer durch Hybridisierungsexperimente abgeschätzten tRNA-Genzahl von etwa 360 (14-16), müßte im Durchschnitt alle 50 kb im Hefegenom ein tRNA-Gen erscheinen. In den hier bearbeiteten Cosmidklonen erscheinen die Gene jedoch im statistischen Mittel alle 22 kb, was einen signifikanten Unterschied zum theoretischen Wert darstellt. Die Verteilung der multiplen Genkopien über das Genom mag demnach nicht so zufallsgemäß erfolgt sein, wie aus den bisher zugänglichen Daten zunächst angenommen wurde (16). Die Verteilung mag eher ein gerichtetes evolutionäres Ereignis mit funktionellem Aspekt darstellen.

3.4. Weitere Charakterisierung der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie

Die chromosomale Lokalisation der einzelnen $tRNA^{Glu}3$-Loci könnte untersucht werden und damit eine Aussage über möglicherweise bevorzugte chromosomale Genorte getroffen werden. Eine elegante Methode dazu besteht in neuerer Zeit durch die Einführung der orthogonalen Elektrophorese im pulsierenden Spannungsfeld (97,98). Hierbei werden intakte Hefezellen direkt in die Agarosematrix eines Geles eingebettet, in dieser mit Detergenzien lysiert, und einem pulsierenden Spannungsfeld ausgesetzt. Es ist dadurch die Trennung ganzer intakter Chromosomen möglich, welche sich durch Standardmethoden (99) auf Nitrozellulosefilter trans-

ferieren lassen. Eine Hybridisierungsanalyse mit chromosomenspezifischen Markern bringt dann die eindeutige chromosomale Zuordnung.
Exemplarisch für den Cosmidklon CYH118 zeigte dies P. Nelböck (persönliche Mitteilung) unter Verwendung der singulären 500 bp BamHI x HindIII DNA-Probe aus pYH118-1, wie sie auch für die Gesamt-DNA-Hybridisierungsanalyse unter 2.5. verwendet wurde. Der in CYH118 repräsentierte $tRNA^{Glu}3$-Locus ließ sich mit dieser Methode dem Hefechromosom II zuordnen.

3.5. Komplexe Organisationsmuster von tRNA-Genen und repetitiven Elementen am Beispiel der Klone CYH7 und CYH118

Im Cosmidklon CYH7 kommt es zu einer äußerst komplexen Anordnung repetitiver Elemente (Abb. 8). Durch ausgedehnte DNA-Sequenzanalysen von R. Stucka (persönliche Mitteilung) aus unserem Labor, der denselben $tRNA^{Glu}3$-Locus in Form eines Plasmidklones pY80 (75) unabhängig isoliert und bearbeitet hat, wird die außergewöhnliche Verschachtelung von repetitiven Elementen deutlich. Hierbei sind Sigma-, Delta- und Tau-Elemente beteiligt. Alle drei Elementklassen zeichnen sich, wie schon in der Einleitung erwähnt, durch spezifische Merkmale aus und besitzen vergleichbare Größen. Sigma-Elemente (40), konnten bisher nur in naher Vergesellschaftung mit tRNA-Genen, 16 - 18 bp entfernt, nachgewiesen werden (95).
Die Situation im Klon CYH7 zeigt nun, daß es zu einer mehrfachen gegenseitigen Insertion dieser transposablen Elemente auf der 5'-tRNA-Genseite gekommen sein muß (Abb. 8b und Abb. 23). Ein komplettes Delta-Element wird durch die Insertion eines Tau-Elementes geteilt. Die Reste (71 bp) eines Sigma-Elementes schließen sich direkt an. Die analoge Situation des entsprechenden Genlocus wurde von T.C. Cooper für einen anderen

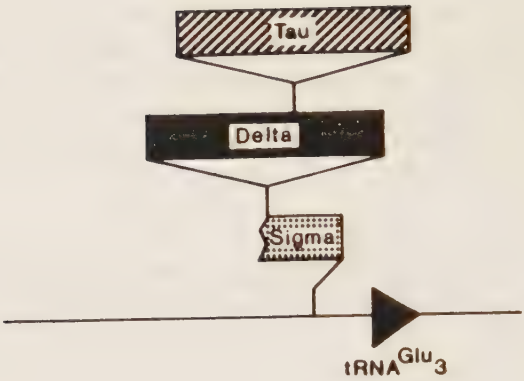

Abbildung 23: Hypothetisches Modell der komplexen Elementintegration wie sie im Cosmid CYH7 repräsentiert ist (43).

Die Integration der einzelnen Elemente erfolgte sukzessive ineinander auf der 5'-Seite des tRNA-Genes: zuerst inserierte ein Sigma-Element; ein Delta- oder Ty-Element transponierte in dieses Sigma, in welches letztendlich wiederum ein Tau-Element inserierte.

Hefestamm (M1362) beschrieben (42,43). Dies deutet daraufhin, daß es möglicherweise bevorzugte Integrationsorte vor bestimmten Genen geben muß. Es ist denkbar, daß die Markierung einer Integrationsstelle durch ein erstes Element weitere Integrationsereignisse an dieser Stelle nach sich zieht.

Eine weitere bemerkenswerte Konstellation zeigt der Klon **CYH118** (Abb. 12 und Abb. 22). Zu beiden Seiten eines kompletten Ty-Elementes befinden sich ein tRNA^{Glu}3- bzw. ein tRNA^{Cys}-Gen in der Art, daß sich das Ty-Element immer auf der 5'-Seite beider tRNA-

Gene befindet. Das $tRNA^{Cys}$-Gen ist zusätzlich von einem weiteren singulären Delta-Element begleitet, wie R. Stucka durch Sequenzstudien in diesem Bereich gefunden hat (persönliche Mitteilung). Der strukturelle Aufbau der Ty-Elemente, wie ihn auch das Ty des Klones CYH118 zeigt, wurde durch die, parallel zu dieser Arbeit angefertigte komplette Sequenzanalyse eines solchen Elementes, geklärt (47). In einem der Delta's befindet sich ein Promotor und eine Sequenz für die Transkriptionsinitiation, im anderen eine mögliche Polyadenylierungsstelle. Im "Promotor"-Delta beginnt ein offenes Leseraster für 440 As (Ty-a) welches in 38 bp von einem zweiten Leseraster für 1328 As (Ty-b) überlappt wird. Dieses zweite Leseraster befindet sich relativ zum ersten in einem "+1 Leserahmen". Die Analogie zu den Retroviren wird auch in der Gesamtanlage des ersten möglichen Proteins (Ty-a) deutlich. Der Wechsel von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren zeigt eine Homologie zu den gag-Polyproteinen der Retroviren. Das zweite mögliche Protein (Ty-b) zeigt eine längere Peptidhomologie zu konservierten Bereichen der Retrotranskriptase derselben Viren. Nachdem die Bildung eines 5 kb Transkriptes durch Ty-Elemente nachgewiesen wurde (96) zeigten neuere Ergebnisse, daß diese Elemente tatsächlich über eine RNA-Zwischenstufe transponieren und somit echte Retroposons darstellen (54). Durch Ty-Überexpression konnten in Hefezellen virusähnliche Partikel im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden (55,56). Bei einem Durchmesser von 60 nm entsprechen sie in ihrer Größe wiederum Retroviren, denen das Hüllprotein fehlt. In der Tat ist der augenfälligste Unterschied im Strukturaufbau zwischen Retroviren und Ty-Elementen das Fehlen eines Gens für Hüllproteine (env-Gen) im Ty. Diese Befunde deuten an, daß Ty-Elemente und Retroviren möglicherweise denselben Ursprung haben, oder anders gesagt, daß es sich bei den Ty-Elementen um defiziente Viren handelt.

```
                                                                  Tau →
         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
TCGAGAATCTTGGAATCCACGAAAGGGAATAGATATTACTCCATAATAATATTATGTTGGAACGAGAGTAATTAATAGTGACATGAGTTGCTATGGTTAA  * 1
TCGAGAATCTTGGAATCCACGAAAGGGAATAGATATTACTCCATAAAAATATTAT------------------------------------------------  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CAATTCAATGCTTACATCGTATATTAATGTACAACTCGTATACGTTTAAGTGTGATTGCGCCTATTGCAGAAGGAATGTTAAACGAGAAGCTCAGACAAT  * 1
--------------------------------------------------------------------------------------------------------  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
ACTGAAGCTGTGTTAAAGACCTATTAGTTGAACATGTTATGGTAGGTACATATATGAGGAATATGAGTCGTCACATCAATGTATAGTAACTACCGGAATC  * 1
--------------------------------------------------------------------------------------------------------  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
ACTATTATATTGTCATGATTAATATGACCAATCGGCGTGTGTTTTATATACCTCTCTTATTTAGTATAAGAAGATCAGTAATTATTTCTTCATTAATACT  * 1
--------------------------------------------------------------------------------------------------------  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
AATTTTTAACCTCTAATTATCAACATATTATTTCTCCTTTCGTTTTATCTGATGTCATTCATTGATTGCCAGCAACTATCCCAAACCTCATGTGATTCTC  * 1
-------------------------------TTCTCCTTTCGTTTTATCTGATGTCATTCATTGATTGCCAGCAACTATCTCAAACCTCATGTGATTCTC  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGATTCCTTACCACGAAAAAACAGATGTGTAAGTGTATTTGAACACACAATAATAAAAATGATTATCATTCCCAGATGGAGGAGCCCATTCCAAACATAG  * 1
GGATTCCTTACCA-GAAAAAACAGATGTGTAAGTGTATTTGAACACACAATAATAAAAATGATTATCATTCCCAGATGGAGGAGCCCATTCCAAACATAG  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CAAAATTCAGCACATCCTCTTCGTTAGCATTTCCGTATGGAAGCAACCCTCAGTCCAACAAATACCGTTTAAACAAATGAGCGACATTTATTCGCTTTTT  * 1
CAAAATT-AGCACATCCTCTTCGTTAGCATTTCCGTATGGAAGCAACC-TCAGTCCAACAAATACCGTTTAAACAA-TGAGCGACATTTATTCGCTTTTT  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CTAAAATAAAGGTCCCCGCTGAAACTTCTTTGCATACAGTTCAAATATTCCACCGTTCTCTTATATGTGGGGCTGGCACTACTTCGTATAATTGACTATA  * 1
CTAAAATAAAGGTCCCCGCTGAAACTTCTTTCGATATAGTTCAAATATT-CACCGTTCTC--ATATGTGGGGCTGGCATTACTTCGTATAATTGACTATA  * 2

                                  Cys →
         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CTATCTATATTAGTCTTCCCACATGTAATAGAAAGCTCGTATGGCGCAGTGGTAGCGCAGCAGATTGCAAATCTGTTGGTCCTTAGTTCGATCCTGAGTG  * 1
CTATCTATATTAGTCTTCCCACATGTAATAGAAAGCTCGTATGGCGCAGTGGTAGCGCAGCAGATTGCAAATCTGTTGGTCCTTAGTTCGATCCTGAGTG  * 2

         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CGAGCTTCTTTTTTTTTTTGCAATCCTTATTGAACTTTTTTTCTTGCTGCAGTCTCCTCAAAGGCAACATGTTCTTTGCTTTTTTTCCCCAACGACGTCG  * 1
CGAGCTTCTTTTTTTTTT-GCAATCCTTATTGAACTTTTTTTCTTGCTGCAG                                                    * 2
```

Abbildung 24: Sequenzvergleich des Klones pFG26 (Linie #1) und der korrespondierenden Sequenz aus CYH118 (Linie #2).

Die Position des tRNA-Genes und seine Orientierung, ebenso wie die im Klon pFG26 auf der 5'-Genseite inserierte Tau-Sequenz, ist angezeigt. Die kurze Verdoppelung der Ziel-Sequenz am Integrationsort zu beiden Seiten des Tau-Elementes ist eingerahmt. CYH118 stellt das Tau(-) Allel dar.

CYH118 zeigt ein weiteres interessantes Detail. Das 1,3 kb HindIII Fragment, welches das $tRNA^{Cys}$-Gen enthält, entspricht dem von T.C. Cooper (42) beschriebenen Plasmidklon pFG26. In pFG26 befindet sich 409 bp vor dem $tRNA^{Cys}$-Gen die Insertion eines Tau-Elementes. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen zwischen CYH118 und pFG26 zeigt Abbildung 24. CYH118 stellt den entsprechenden Tau^{-}-locus dar. Dies ist ein direkter Hinweis auf den transposablen Charakter dieser Elementklasse.

3.6. Entstehung von homo- und heterozygoten Ty-Insertionen

Sieht man die Insertion eines transposablen Elementes als zufälliges Ereignis an, so ist die Integration eines solchen Elementes im diploiden Zustand nur auf einem der paarweise auftretenden Chromosomen zu erwarten. Eine heterozygote Allelbildung wäre die Folge eines solchen Transpositionsereignisses. Im Falle der oben beschriebenen Klone pY109/pYH22 trifft dies zu (Abb. 19). Sie unterscheiden sich in der Ty-Insertion und stellen ein Ty^{+}/Ty^{-}-Allelpaar dar.
Im Falle von CYH118 zeigt die Gesamt-DNA-Hybridisierungsanalyse eine homozygote Ty-Insertion an (2.5.), d.h. daß beide in der diploiden Hefe C836 existierenden Allele das Ty-Element tragen. Haplonten, die nach der Sporulation dieses Stammes von G. Mannhaupt (persönliche Mitteilung) erhalten wurden, zeigen ebenfalls nur dieses Ty^{+}-Allel (nicht gezeigt).
Geht man weiterhin von der Zufälligkeit solcher Insertionsereignisse transposabler Elemente aus, läßt sich die Entstehung von homo- und heterozygoten Ty-Insertionen, die in einem diploiden Organismus nebeneinander vorkommen, nur auf zwei Arten erklären. Die eine Möglichkeit, welche die homozygote Insertionsbildung betrifft, ist eine Genkonversion. Diese wird als eine nichtreziproke Rekombination definiert (100). Ein reziprokes Rekombinationsereignis würde dagegen die DNA-Flanken, d.h. die dem Element benachbarten genomischen Bereiche, in den Vorgang mit einbeziehen

(60). In der Gesamt-DNA-Hybridisierungsanalyse würden dann unterschiedliche Fragmentlängen sichtbar werden. Dies trifft im Falle von CYH118 jedoch nicht zu (2.5.).
Die andere Möglichkeit setzt mehrere Ereignisse voraus. In einer von zwei Ty insertionsidentischen haploiden Vorläuferzellen müßte es zu einer zusätzlichen Ty-Insertion gekommen sein. Ein Wechsel im Paarungstyp ("Mating-type"; 101) dieser Zelle ermöglichte es den beiden Vorläuferzellen, den Diplonten C836 zu bilden. Die Wahrscheinlichkeit, daß dies im Laufe der Evolution geschah, ist, wenn auch nicht auszuschließen, so doch als äußerst gering anzusehen. Die wahrscheinlichste Erklärung für die nebeneinander vorkommende Existenz von homo- und heterozygoten Ty-Insertionen im diploiden Zustand ist demnach die Genkonversion.

3.7. Differentielles Expressionsverhalten eines tRNA-Genes

Die Redundanz der einzelnen Hefe tRNA-Gene verhinderte es bisher, Expressionsstudien in vivo vorzunehmen, da ein beobachteter Effekt nie einem definierten Locus zugeordnet werden konnte. Dies ist nur bei singulären Genen bzw. Suppressor-tRNA-Genen möglich (102). Zur Umgehung dieses Problemes wurde für Expressionsstudien das Xenopus laevis Oozytensystem gewählt. Nach Mikroinjektion fremder tRNA-Gene werden diese in den Oozyten funktionsrichtig transkribiert und prozessiert (103).

Vorangegeganene Experimente gaben einen Hinweis darauf, daß die Anwesenheit bestimmter Elemente in der Nachbarschaft von Hefe tRNA-Genen mit unterschiedlicher Transkriptionsaktivität korreliert ist (75). So zeigte z.B. das $tRNA^{Glu}3$-Gen, assoziiert mit einem kompletten Ty-Element, in pYH118-1 eine 10mal bessere Expressionsrate als der Klon pY106, in welchem das $tRNA^{Glu}3$-Gen von einem Delta-Element begleitet wird.
Die Isolierung des Ty^{+}/Ty^{-}-Allelpaares in Form der Klone pY109/pYH22 bietet nun ideal vergleichbare Wildtypsituationen. Durch die Konstruktion von in vitro Mutanten, in denen unters-

chiedliche Teile des Ty-Elementes entfernt oder umgeordnet wurden, lassen sich funktionelle Einflüsse direkt den dafür verantwortlichen definierten Sequenzbereichen des Elementes zuordnen.
Der direkte Vergleich der beiden Wildtypallele (pY109, pYH22) zeigte, daß das Ty^+-Allel das tRNA-Gen ca. 6mal besser exprimiert als das Ty^--Allel (Abb. 20B). Die daraufhin konstruierten Derivate pYH109-1 bis pYH109-7 ließen den transkriptionsaktivierenden Effekt sich einem 0,59 kb PvuII x BglII Fragment zuordnen. Dieses Fragment enhält, neben einer kurzen Region außerhalb des Ty und ca. 130 bp des inneren Ty-Segmentes, das "Promotor" Delta-Element des Ty-Elementes.
Entfernt man das gesamte Ty-Element aus pY109, wie es der Konstrukt-Klon pYH109-1 zeigt, erhält man in den Oozyten eine tRNA-Genexpressionsrate, wie sie dem Wildtyp Ty^--Allel (pYH22) entspricht. Die Deletion der Ty-5'-Hälfte, wie sie in Klon pYH109-2 repräsentiert ist, führt zu dem gleichen Ergebnis. Der transkriptionsaktivierende Einfluß auf die tRNA-Genexpression muß also in dieser 5'-Ty-Hälfte lokalisert sein. Dies zeigen auch sehr deutlich die Konstrukt-Klone pYH109-3 und pYH109-4, wo eben diese 5'-Ty-Hälfte, unter Entfernung des 3'-Ty-Endes, näher an das tRNA-Gen herangerückt wurde. Im Falle von pYH109-3 bis auf eine Entfernung von 3,1 kb, im Falle von pYH109-4 sogar bis auf 2,4 kb. Eine deutliche Expressionssteigerung ist mit diesem Vorgehen verbunden, wobei sich ein Positionseffekt zeigt: die Transkriptionsaktivität von pYH109-4 ist ungefähr um den Faktor 3 höher als im Ty^+-Allel.
Läßt man die Enden des Ty intakt und deletiert in pYH109-5 ein inneres Ty-Segment, wodurch die Leseraster (vgl. 3.3.) des Elementes völlig zerstört werden, hat dies überhaupt keinen Einfluß auf die transkriptionsaktivierende Wirkung. Wird der aktivierende Sequenzbereich in seiner Orientierung relativ zum tRNA-Gen wie in pYH109-6 umgedreht, oder auf die andere tRNA-Genseite wie in pYH109-7 positioniert, hat dies ebenfalls keinen Einfluß auf die aktivierende Wirkung.

Die erhaltenen Daten zeigen, daß die Transkriptionsaktivierung von tRNA-Genen durch die Ty-"Promotor"-Region stark an Eigenschaften von "Enhancer"-Elementen erinnern (84):

- Aktivierung der Transkription eines in cis lokalisierten Genes,
- Transkriptionsaktivierung unabhängig von der Orientierung,
- Fähigkeit über lange Distanzen, von einer Position vor oder hinter dem aktivierten Gen aus, zu wirken.

Im Fall des Ty^+-Alleles (pY109) wirkt der transkriptionsaktivierende Einfluß des Ty-"Promotor"-Elementes über eine Distanz von 8,0 kb.
Die spezifische cis-Funktion zeigt sich in dem Kontrollexperiment durch die Mikroinjektion des Klones prd. Das Ty-"Promotor"-Element allein zeigt keine Genaktivierung (Abb. 20A).

Die Aktivierung eines zweiten Genes durch dasselbe Element bzw. Elementsegment wurde hier, wie auch in den früheren Experimenten bei der Mikroinjektion von verschiedenen $tRNA^{Glu}3$-Genen mit ihren begleitenden Elementen (75), nicht untersucht. Für zukünftige Experimente dieser Art würde sich CYH118 (Abb. 12) als Ausgangsklon anbieten. Durch die Lokalisierung eines $tRNA^{Glu}3$- und $tRNA^{Cys}$-Genes zu beiden Seiten eines Ty-Elementes könnten weitere Aufschlüsse über die Allgemeingültigkeit dieses Phänomens gewonnen werden.

In neueren Arbeiten wird "Enhancer" Kern-Sequenzen (104), die im inneren Ty-Segment lokalisiert sind, eine Funktion in der Kontrolle oder "Enhancer"-ähnlichen Stimulierung von bestimmten Hefegenen zugeschrieben (63,64). Es handelt sich hierbei um Gene, die durch RNA-Polymerase II transkribiert werden. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß im Klon pYH109-5 auch diese Sequenzen deletiert wurden, ohne die "Enhancer"-Wirkung des "Promotor"-Ty-Elementes auf die tRNA-Genexpression durch die RNA-Polymerase III zu beeinflussen. Dies zeigt an, daß in der Aktivierung von Genen, welche durch unterschiedliche RNA-Polymerasen transkribiert werden, möglicherweise auch unterschiedliche Ty-Sequenzelemente involviert sind. Da das Erscheinen von Kern-Sequen-

zen nicht für eine "Enhancer"-Wirkung essentiell ist (84), bleibt die Definition eines "Enhancer"-Elementes eher funktionell zu fassen.

Eine mögliche Erklärung des Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch ein definiertes DNA-Segment kann die Beteiligung an der Bildung einer spezifischen Chromatinstruktur sein, welche eine transkriptionsaktivere Domäne darstellt. Dieses Prinzip wurde für mehrere "Enhancer" beschrieben und wäre auch im hier verwendeten Expressionssystem wirksam, da in Xenopus Oozyten die korrekte Chromatinstruktur ausgebildet wird (103,105). Beispielsweise zeigt im SV40 Virus dessen "Enhancer" eine nukleosomenfreie Chromatinstruktur (106), wie sie oft in genregulatorischen Bereichen aktiver Gene beobachtet werden.

Die biologische Relevanz der Fähigkeit der Transkriptionsaktivierung von tRNA-Genen durch assozierte Elemente liegt möglicherweise in der Feinabstimmung der Genexpression innerhalb einer Multigenfamilie. Die Expressionstärke der individuellen Genfamilienmitglieder würde dann von der Art der sie begleitenden repetitiven Elemente abhängen.

Als weiteres experimentelles Vorgehen wäre die direkte Untersuchung der Chromatinstruktur im genomische Bereich von Ty-Insertionen in der Hefe möglich. Durch die Sporulierung des Hefestammes C836 in Haplonten, welche entweder das Ty^+- oder Ty^--Allel tragen, ist diese Möglichkeit gegeben.
Ein weiterer Schritt ist die in situ Untersuchung der in Xenopus laevis Oozyten erhaltenen Expressionsergebnisse, d.h. die Durchführung von tRNA-Expressionstudien direkt in der Hefe. Wegen der angesprochenen tRNA-Genredundanz müßte ein individuelles tRNA-Gen geschaffen werden. Denkbar ist, die Existenz einer Endonuklease-spaltstelle in der Anticodonschleife des $tRNA^{Lys}1$-Genes auszunutzen, indem ein synthetisches Oligonukleotid (24mer) eingesetzt wird. Nach Kopplung mit verschiedenen Elementen oder Elementteilen wäre mit Hilfe geeigneter Vektorsysteme die Transformation

von Hefe möglich. Das so konstruierte und in Hefe etablierte Gen müßte weiterhin exprimiert werden und sein Transkript eindeutig, mit Hilfe der Oligonukleotidsequenz, zu identifizieren sein.

4. Material und Methoden

4.1. Material

a) Versuchstiere:
Frösche: Xenopus laevis, weiblich; The South African Snake and Rattle Farm, Fish Hoek, South Africa

b) Enzyme:
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, T4-DNA-Ligase, DNase I, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, Ribonuklease A, Polynukleotidkinase, Restriktionsendonukleasen: Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Polymerase: New England Biolabs, Beverly, USA
Proteinase K: Merck, Darmstadt
Lysozym: Serva, Heidelberg
Zymolyase 5000: Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan

c) Radioaktivität:
(α-^{32}P)-dATP, (α-^{32}P)-dCTP, (α-^{32}P)-GTP und (γ-^{32}P)-ATP: New England Nuclear (NEN), Dreieich

d) Antibiotika:
Ampicillin (Amblosin): Bayer, Leverkusen
Tetracyclin (Achromycin): Cyanamid, Wolfratshausen
Streptomycin: Serva, Heidelberg
Penicillin: Grünenthal, Stolberg

e) Chemikalien und Nährmedien:
Basischemikalien, Ethidiumbromid, Polyethylenglykol 6000, EDTA (Titriplex III), Bromphenolblau, Xylencyanol, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Hefeextrakt: Merck, Darmstadt
Desoxyribonukleotidtriphsophate, Adenosin-5'-Triphosphat, Tris, Dithioerythritol, HindIII-Linker, Phagen λ-DNA: Boehringer, Mannheim

Ficoll 400, Rinderserumalbumin (BSA), DNA aus Lachssperma, Glukose, Isopropylthiogalaktosid, Polyvinylpyrrolidon, Sarkosyl: Sigma, München
SeaKem Agarose: Marine Colloids, Rockland, USA
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Pepton: Difco, Detroit, USA
M13-17bp Einzelstrangprimer: P.L. Biochemicals, Ulmenhof
Acrylamid, Putrescin, SDS: Serva, Heidelberg
Caesiumchlorid, N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid, 5-Bromo-4-Chloro--3-Indoloyl-β-D-Galaktosid (X-Gal): Biomol, Ilversheim
AG 501-X8 Mischbettionentauscher: Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
Spermin, Spermidin: Fluka, Neu-Ulm
Sephadex G 50: Pharmacia, Uppsala, Schweden
cos-Stellen Oligonukleotide (ON-R, ON-L): New England Biolabs, Beverly, USA
Dimethyldichlorsilan: BDH Chemicals Ltd., Pool, England
Primogonyl-250 (Choriongonadotrophin): Schering, Berlin

f) Bakterien- und Hefestämme:
Die Bakterienstämme E. coli 490A, E. coli LE 392 und E. coli JM 103 wurden von M. Pech (München) zur Verfügung gestellt. Der E. coli Stamm AZ 1069 von H. Lehrach (Heidelberg). Die Stämme E. coli BHB 2688 und E. coli BHB 2690 wurden von W. Piepersberg (München) erhalten.
Der Hefestamm Sacharomyces cerevisiae C 836 von H. Feldmann (München).

g) Phagen, Plasmide und Cosmide:
Die für die Sequenzanalysen benötigten Phagen M13 mp8, mp9, mp10 und mp11 und das Plasmid pBR322 wurden ebenfalls von M. Pech zur Verfügung gestellt.
Das Plasmid pUC9 von F. Fittler (München).
Das Cosmid pYC3030 wurde ebenfalls von W. Piepersberg erhalten.

h) Sonstiges:

Nitrozellulosefilter BA 85: Schleicher & Schüll, Dassel
"GeneScreenPlus" Hybridisierungsmembran: New England Nuclear (NEN), Dreieich
RX-Röntgenfilme: Fuji Photo Co., Tokyo, Japan
Curix MR600 Verstärkerfolien: Agfa-Gevaert, Leverkusen
4x5 Land-Filme: Polaroid Co., Cambridge, USA
Vicryl- und Catgut-Nahtmaterial: Ethicon, Norderstedt
Borsilikatgläser 1,1 mm Durchmesser: Hilgenberg, Malsfeld

4.2. Methoden

4.2.1. Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe

Hochmolekulare DNA des Hefe-Stammes C836 wurde wie in Referenz (107) beschrieben isoliert.
Die Zellen wurden für 16 Stunden bei 30°C bis zur frühen stationären Phase angezogen. Mit Zymolyase 5000 wurden sie spheroblastiert und schließlich in Sarcosyl lysiert. Das Lysat wurde sofort durch einen Sucrosegradienten (linear 10%-20% Sucrose unterschichtet mit einem 50% Sucrose-Kissen) für 3 Stunden bei 26 000 upm. (SW27-Rotor) zentrifugiert und die hochviscöse DNA als 6 ml Fraktion vom Boden eines jeden SW27 Zentrifugenröhrchen gesammelt. Nach einer Dialyse gegen TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) konnte die DNA sofort mit Restriktionsendonukleasen gespalten werden.
Die Anzuchten wurden immer aus einer stationären Kultur angeimpft.

4.2.2. Partialverdau der hochmolekularen Hefe-DNA

Der Zustand der Hefe-DNA wurde zuerst auf einem 0,3% Agarosegel getestet. Als Marker wurde DNA des Phagen T5 (106 kb), welche freundlicherweise von G. Combriato (München) zur Verfügung gestellt wurde, und das Monomer (48,5 kb) und Dimer (97 kb) des Phagen λ aufgetragen. Die isolierte C836-DNA zeigte eine Größe von 100-90 kb und konnte für den Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease Sau3A verwendet werden.
Zuerst wurde die DNA einer analytischen Verdauung unterworfen um die Reaktionsbedingungen festzulegen. Jeweils 1 µgr DNA wurde mit 0,5 Einheiten Restriktionsendonuklease Sau3A verschiedene Zeiten inkubiert. Die Reaktionen wurden mit Phenol abgestoppt und auf einem 0,4% Agarosegel analysiert.

Zur präparativen Spaltung wurden 3 geeignete Zeitpunkte ausgewählt, welche DNA-Partialfragmente von >40 kb (kurze Inkubationszeit), von 35 - 45 kb (korrekte Inkubationszeit) und von <35 kb (lange Inkubationszeit) lieferten. Pro Reaktion wurden jeweils 30 µgr Hefe-DNA inkubiert. Insgesamt wurden 12 Ansätze verdaut. Die Reaktionen wurden ebenfalls durch Phenol inaktiviert, vereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

Die in 200 µl TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendierten Partialfragmente wurden auf ihre Ligierbarkeit hin getestet. 1 µgr DNA wurde mit T4-Ligase inkubiert und das Reaktionsergebnis wiederum auf einem 0,3% Agarosegel überprüft. Für die Bildung von Koncatemeren mußte die DNA-Konzentration im Ligierungsansatz >120 µgr/ml sein.

Um Ligierungsartefakte, d.h. das Zusammengehen von DNA-Fragmenten verschiedener genomischer Bereiche, zu vermeiden, wurde die partialverdaute DNA mit alkalischer Phosphatase (0,05 Einheiten/µgr DNA) behandelt. Das Enzym wurde durch Phenol und anschließender Ethanolpräzipitation inaktiviert. Ein nachfolgender Ligierungsversuch mit T4-Ligase und gelelektrophoretische Analyse zeigte den Behandlungserfolg.

Die Größenfraktionierung der dephosphorilierten Partialfragmente wurde in einem NaCl-Gradienten vorgenommen (1,25 M - 5 M NaCl). Der Gradient wurde für 3 Stunden bei 39 000 upm. in einem SW41-Rotor zentrifugiert (108). Danach wurden die einzelnen Fraktionen auf einem 0,4% Agarosegel überprüft und diejenigen, welche eine Fragmentgrößenklasse von 35 - 45 kb umfaßten, vereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

Diese DNA wurde zur Konstruktion der Cosmidgenbank verwendet.

4.2.3. Konstruktion der Vektorarme

Die Vektorarme wurden aus dem Cosmid pYC3030 (68) isoliert. Dies ist ein Derivat des Cosmides pHC79 (109) mit einer Größe von 10315 bp. Es trägt zusätzlich den Replikationsursprung des 2µ-Plasmides und das HIS3-Gen aus Hefe. Somit handelt es sich um einen "shuttle"-Vektor der sowohl eine Replikation und Selektion in E. Coli als auch in Saccharomyces cerevisiae zuläßt (Abb. 1).

Als Vektorarme wurden das 10,0 kb ClaI x BamHI-Fragment und das 7,7 kb BstEII x BamHI-Fragment verwendet. Die Arme wurden analog zu der Referenz (110) hergestellt. 20 µgr pYC3030-DNA wurden mit ClaI bzw. BstEII gespalten. Die so enstandenen Spaltenden wurden mit alkalischer Phosphatase wie unter 4.2.2. beschrieben behandelt um spätere Ligierungsartefakte zu vermeiden. Um die endgültigen Fragmente zu erhalten wurden beide Ansätze mit der Restriktionsendonuklease BamHI nachgespalten und nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 0,8% Agarosegel aus diesem durch Elektroelution (vgl.4.2.11.) isoliert.

Sämtliche Manipulationen zur Herstellung der Vektorarme (Restriktionsspaltungen, Phosphatasebehandlung) wurden elektrophoretisch überprüft.

4.2.4. Ligierung von Vektor- und Donor-DNA

Die Ligierungen wurden bei 16°C mit 1 Einheit T4-Ligase für 15 Stunden durchgeführt.
Es wurden gleiche molare Verhältnisse von Vektorarmen zur Donor-DNA eingesetzt: in einem Ligierungsvolumen von 20 µl 4 µgr Donor-DNA und je 1 µgr eines jeden Vektorarmes.

4.2.5. Präparation der Extrakte zur in vitro Verpackung von Cosmid-DNA in Phagenhüllen

Die Herstellung der Verpackungsextrakte wurde wie in Referenz (111) beschrieben durchgeführt.

Der Gefriertauextrakt (FTL) wurde aus dem E. coli Stamm BHB 2688 und der Beschallungsextrakt (SE) aus dem E. coli Stamm BHB 2690 (112) gewonnen. Beide Stämme wurden zuvor auf Wachstum bei permissiver (30°C) und nicht permissiver (42°C) Temperatur getestet.

Die Eignung der präparierten Extrakte wurden mit Wildtyp-DNA des Phagen λ und dem E. coli Stamm LE 392 als Wirt getestet. Es wurden $4x10^8$ Plaques pro 1 µgr verpackter λ-DNA erzielt.

4.2.6. in vitro Verpackung von Cosmid-DNA in Phagenhüllen

Jeweils 5 µl (1 µgr Donor-DNA) aus einem Ligierungsansatz (vgl.4.2.4.) wurden mit denen unter 4.2.5. beschriebenen Extrakten in vitro verpackt. Dazu wurden 15 µl des Beschallungsextraktes (SE) mit 10 µl des Gefriertauextraktes (FTL) gemischt, die zu verpackende DNA zugegeben und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml SM-Phagenpuffer (100 mM NaCl; 8 mM $MgSO_4$; 50 mM Tris pH 7,5; 2 % Gelatine) und einem Tropfen Chloroform

aus einer Pasteurpipette, konnten die Phagen ohne Aktivitätsverlust bei 4°C mehrere Monate lang aufbewahrt werden.

4.2.7. Transduktion

Die verpackten Cosmide wurden an λ-sensitive Bakterien adsorbiert. Es wurde der E. coli Stamm 490A als Wirtsorganismus verwendet, dessen $recA^-$ Mutation im Vergleich zu E. coli LE 392 (rec^+) und E. Coli HB 101 ($recA^-$) getestet wurde (113).
Die Ausbildung der Phagenrezeptoren auf den Bakterien wurde durch Aushungern in $MgSO_4$ induziert (114).

Die verpackten Cosmide wurden mit 2 Volumen der ausgehungerten Bakterien versetzt und für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 Volumen Vollmedium (LB_0) wurde für weitere 30 Minuten bei 37°C bebrütet um die mit dem Cosmidvektor eingebrachte Ampicillinresistenz zu exprimieren. Danach wurden die Zellen auf Ampicillin-Selektionsagarplatten (100 µgr/ml Ampicillin) ausgestrichen und bis zum Erscheinen von Einzelkolonien bei 37°C weiterinkubiert.

4.2.8. Koloniefilterhybridisierung der Cosmid-Genbank

Um die Genbank mit verschiedenen radioaktiv markierten DNA-Proben abzusuchen, wurden identische Koloniemuster der Originalagarplatten auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll BA 85) wie in (115) beschrieben angelegt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden Filterkopien direkt auf Glyzerinagarplatten (5% Glyzerin) bei -20°C verwahrt. Von diesen war es, wenn nötig, wieder möglich 2-4 Filterkopien anzufertigen.
Die Kolonien der für die Hybridisierungen vorgesehenen Filter wurden wie in (116) von W.D. Benton und R.W. Davis beschrieben lysiert und denaturiert.

Hybridisierungen wurden immer wie in 4.2.11. beschrieben ausgeführt.

4.2.9. Radioaktive Markierung von DNA

Die für die Hybridisierungsexperimente notwendigen DNA-Suchproben wurden durch "Nicktranslation" (117,118) mit (α-^{32}P)-dATP und (α-^{32}P)-dCTP unter Verwendung von DNA-Polymerase I markiert.

Die "Endmarkierung" der für die schnelle Cosmidkartierung nach Lehrach benötigten Oligonukleotide und der DNA-Markerfragmente wurde mit (γ-^{32}P)-ATP und Polynukleotidkinase (119) vorgenommen.

4.2.10. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

Sowohl aus Agarose- als auch aus Polyacrylamidgelen wurden die DNA-Fragmente mittels der Elektroelution wie in (113) beschrieben isoliert.
Nach einer Ethanolpräzipitation wurden die Fragmente direkt für die vorgesehenen Versuche verwendet.

4.2.11. Transfer von DNA aus Gelen auf eine Membran zur Hybridisierung

Elektorphoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurde nach der Methode von E.M. Southern (99) auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schüll BA 85) transferiert.
Der Transfer auf "GeneScreenPlus"-Membranen (NEN) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Hybridisierung sämtlicher Filter mit radioaktiv markierten DNA-Proben wurde bei 68°C wie in (120) beschrieben ausgeführt.

Die Hybridisierung von Filtern mit ^{125}I-markierter Gesamt-tRNA aus Hefe, welche von H. Feldmann erhalten wurde, wurde bei 56°C wie in (21) vorgenommen.

4.2.12. Subklonierung von DNA-Fragmenten

Geeignete DNA-Fragmente aus Cosmidklonen wurden wie in 4.2.11. beschrieben isoliert und im Plasmidvektor pBR322 (77,78) subkloniert. Dieser Vektor wurde auch für die Etablierung verschiedener Konstrukte für die Oozyten-Mikroinjektion verwendet.
Für die DNA-Sequenzanalyse wurden Subklone im Phagenvektor M13 mp8, mp9, mp10 und mp11 (74) etabliert.

Bei der Ligierung wurden äquimolare Mengen von Vektor- und zu klonierender DNA eingesetzt und die Reaktion wie in (121) ausgeführt.

Um ein Rezirkularisieren des Vektores mit sich selbst zu verhindern, wurde dieser nach der Restriktionsspaltung immer mit alkalischer Phosphatase behandelt (122).

Existierten im Vektor bzw. zu klonierenden DNA-Fragment keine homologen Spaltstellen, wurden diese mittels Klenow-Polymerase (5'-überhängende Enden) oder T4-DNA-Polymerase (3'-überhängende Enden) in glatte Enden umgewandelt (113,123).

Bei der Klonierung der Konstrukte für die Oozyten-Mikroinjektion war es notwendig, verschiedene Spaltstellen mit Hilfe eines synthetischen Linkers in eine HindIII-Stelle umzuwandeln. Die Linkeraddition wurde wie in (124) beschrieben ausgeführt.

4.2.13. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

E. coli 490A Bakterien wurden nach der Methode von M. Dagert und S.D. Ehrlich (125) mit rekombinanten Plasmiden transformiert. DieZellen wurden auf Ampicillin-Selektionsagarplatten (100 µgr/ml Ampicillin) ausgestrichen.

4.2.14. Transfektion von Bakterien mit Phagen-DNA

E. coli JM103 Bakterien wurden mit rekombinanter M13 Phagen-DNA wie in Referenz (81) beschrieben transfektiert. Durch das Unvermögen rekombinanter Klone das chromogene Substrat X-Gal zu spalten, konnten diese anhand der Farbe des enstehenden Plaques identifiziert werden.

4.2.15. Isolierung von Cosmid-, Plasmid- und Phagen-DNA

Cosmid-, Plasmid- und M13-RF-DNA wurden nach der Methode von H.C.Birnboim und J. Doly (126) mit einer geringen Modifikation nach D. Ish-Horowicz und J.F. Burke (110) präpariert. Hierbei wurden die Ethanolfällungen der DNA durch solche mit Isopropanol ersetzt. Die so erhaltene DNA wurde dann über zwei folgende Ethidiumbromid/Caesiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugationen (127) gereinigt.

Einzelstrang-M13-DNA zur Sequenzanalyse wurde wie in Referenz (128) beschrieben isoliert.

4.2.16. Schnelle Restriktionskartierung von Cosmid-DNA

Nach Bedarf wurden Cosmide mit Hilfe der schnellen Restriktionsanalyse nach H. Lehrach (79) kartiert. Um die zirkulären Cosmide an der cos-Stelle zu linearisieren, wurde ein Terminase-Extrakt wie in (80) beschrieben aus dem E. coli Stamm AZ 1069 hergestellt.

4.2.17. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung in den Phagen M13 subklonierter DNA-Fragmente wurde mit Hilfe der "Didesoxy-Kettenabbruch"-Methode durchgeführt (76).
Die DNA-Sequenzen wurden mit einem MINC 23-RT11 Computer System, unter Zuhilfenahme der Programme von R. Staden (129) und P.S. Neumaier (130), analysiert.

4.2.18. Mikroinjektion in Xenopus Oozyten und Analyse der RNA

DNA Lösungen (20 nl) wurden in die Kerne von Xenopus Oozyten wie in Referenz (103) beschrieben injiziert. Die DNA wurde zuvor durch Caesiumchloriddichtegradientenzentrifugation (vgl. 4.2.15.) gereinigt und in 10 mM Tris pH 7,5; 80 mM NaCl bei einer Konzentration von 1 µgr/2,5 µl gelöst.
Nach einer 15 - 18 stündigen Inkubation bei 16°C wurde, um die entstehende RNA zu markieren, 0,2 µCi von (α-^{32}P)-GTP ins Cytoplasma der Oozyten injiziert. Es folgte eine weitere Inkubation für 18 Stunden bei 16°C.
Während dieser ganzen Zeit wurden die Oozyten in Barth-Medium (131) gehalten.
Die RNA wurde danach ebenfalls wie in (103) beschrieben aus den Oozyten extrahiert und auf denaturierenden 10% Polyacrylamidgelen analysiert. Anhand der Autoradiographien dieser Gele wurden die

einzelnen RNA-Banden daraus ausgeschnitten und die Radioaktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung im Szintillationsspektrometer bestimmt.

Eine Woche vor Durchführung der Experimente wurden die Versuchstiere jeweils mit 100 Einheiten Primogonyl-250 (Choriongonadotrophin) subcutan stimuliert. Die Oozyten wurden am Versuchstag operativ aus dem Abdomen entnommen.

4.2.19. Biologische Sicherheit

Alle Experimente mit infektiösem Material wurden entsprechend den "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neurekombinierte Nukleinsäuren" (4. überarbeitete Fassung des Bundesgesundheitsamtes, August 1981) unter L2/B1-Bedingungen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der genomischen Organisation des genetischen Materials einer tRNA-Multigenfamilie aus Hefe. Ferner wird das differentielle Expressionsverhalten eines tRNA-Genes in Abhängigkeit seines besonderen genetischen Umfeldes untersucht.

Die tRNA-Gene aus Hefe stellen distinkte Multigenfamilien dar, deren Mitglieder als singuläre Transkriptionseinheiten über das Genom verteilt sind. Die Anzahl der einzelnen Mitglieder einer solchen eukaryotischen Multigenfamilie wird im Durchschnitt auf 10-12 unabhängige Genkopien geschätzt; für die $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie wird aufgrund von Hybridisierungsexperimenten eine Kopienzahl von 14 angenommen.
Als Besonderheit wurde in der Hefe bei verschiedenen tRNA-Genen die Assoziation mit verschiedenen repetitiven Elementen beobachtet. Alle zeigen sie transposable Eigenschaften und unterscheiden sich stark in ihrer Größe. Neben dem Ty-Element mit einer Größe von 5,9 kb werden die "kurzen" Elemente (330-370 bp) in Delta-, Sigma- und Tau-Sequenzen eingeteilt. Alle diese Elemente können sehr komplexe genomische Anordnungen bilden.

Um Aussagen über die Verteilung solcher Elemente innerhalb einer tRNA-Multigenfamilie treffen zu können, wurden hier verschiedene Mitglieder der $tRNA^{Glu}3$-Multigenfamilie auf genomischer Ebene charakterisiert. Dazu wurde zuerst eine Hefe-Cosmidgenbank konstruiert, welche im Durchschnitt eine DNA-Insertionsgröße von 35 kb besaß. So war es möglich große DNA-Bereiche, d.h. die $tRNA^{Glu}3$-Loci zusammen mit ihren benachbarten Sequenzen, und möglicherweise darin lokalisierten repetitiven Elementen, zu isolieren. Sieben $tRNA^{Glu}3$-Loci wurden in dieser Weise in Form von 8 Cosmidklonen durch Erstellung der physikalischen Karte und anschließender DNA-Sequenzanalyse der tRNA-Loci beschrieben. Damit wuchs der Katalog von isolierten $tRNA^{Glu}3$-Genen auf insgesamt 11 unabhängige Mitglieder der Multigenfamilie. Dies erlaubte es erstmals, repräsentative Aussagen über die genomische Organi-

sation innerhalb einer solchen Multigenfamilie zu machen. Tatsächlich hat sich ergeben, daß die Mehrheit der Klone ein repetitives Element auf der 5'-Seite des $tRNA^{Glu}3$-Gens besitzt, wobei sämtliche Elementklassen nachgewiesen wurden. Durch Hybridisierungsexperimente und DNA-Sequenzierung konnte in 4 Loci neben dem $tRNA^{Glu}3$-Gen noch ein weiteres tRNA-Gen, welches sich immer in entgegengesetzter Orientierung zu dem jeweiligen $tRNA^{Glu}3$-Locus befindet, identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um die Gene für die $tRNA^{Ala}1$, $tRNA^{Asp}$, $tRNA^{Cys}$ und $tRNA^{His}2$. Außer dem $tRNA^{Asp}$-Gen zeigen die anderen drei Gene ebenfalls die Insertion eines repetitiven Elementes auf ihrer 5'-Genseite. Aus dem Gesamtbild dieser Daten erhält man den Hinweis, daß die spezifische Vergesellschaftung von tRNA-Genen und repetitiven Elementen nicht zufällig ist, sondern in einem funktionellen Zusammenhang gesehen werden muß.

Ein möglicher Einfluß der repetitiven Elemente auf die tRNA-Genexpression wurde nach Mikroinjektionexperimenten in Xenopus laevis Oozyten untersucht. Als Modell diente ein $tRNA^{Lys}1$-Gen, welches mit einem Ty-Element vergesellschaftet ist. Der entsprechende Klon wurde charakterisiert. Die DNA-Sequenz des Ty-Elementes wurde unter Beteiligung des Autors parallel zu dieser Arbeit ermittelt. Hinsichtlich mehrerer Kriterien, wie seiner Genanordung und Expression, erinnnert das Ty-Elementes stark an die genomische Organisation von Retroviren und ist als Retroposon anzusprechen.
Nach der Kenntnis dieses Ty^+-Allels gelang es, den entsprechenden $tRNA^{Lys}1$-Locus auch als Ty^--Allel aus der Cosmidgenbank zu isolieren. Das ermöglichte es, vergleichende Expressionsstudien in Xenopus laevis Oozyten durchzuführen. Der direkte Vergleich zeigte, daß das tRNA-Gen des Ty^+-Allels ca. 6mal besser exprimiert wird als das tRNA-Gen des Ty^--Allels. Durch die Konstruktion einer Anzahl von Varianten, in denen bestimmte Segmente des Ty-Elementes entfernt oder umgeordnet wurden, wurde gezeigt, daß der die tRNA-Genexpression stimulierende Effekt einem definierten Ty-Segment zugeordnet werden kann. Dieses Ty-Segment, das sogenannte "Promotor-Delta", enthält die Ty-Transkriptionsinitiation. Die Aktivierung der Transkription des $tRNA^{Lys}1$-Gens ist unabhän-

gig von der Orientierung oder Entfernung dieses Segmentes zum tRNA-Gen oder seiner Lokalisierung stromauf oder stromab vom Gen. Dieses Verhalten deckt sich mit den Eigenschaften von eukaryotischen "Enhancer"-Elementen, welche sich durch eine transkriptionsaktivierende Wirkung auf durch RNA-Polymerase II transkribierte Gene auszeichnen. Hier handelt es sich erstmals um die Beschreibung der "Enhancer"-ähnlichen Aktivierung eines durch RNA-Polymerase III transkribierten Genes.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu der Vorstellung bei, daß es bei den eukaryotischen tRNA-Genen eine Expressionsaktivierung gibt, welche durch bestimmte Sequenzelemente gesteuert wird. Die biologische Funktion dieser Aktivierung liegt möglicherweise in der Feinregulation der tRNA-Expression innerhalb einer tRNA-Multigenfamilie. Denkbar ist, daß je nach der Art der mit den tRNA-Genen assoziierten Elemente, das Expressionsverhalten eines bestimmten Gen-Locus moduliert wird. Nachdem bisher nur regulierende Einflüße über relativ kurze genomische Distanzen in der 5'-Genseite von tRNA-Genen untersucht wurden, hat sich als novum hier gezeigt, daß es auch expressionsregulatorische Wirkungen über einen relativ langen Bereich gibt. Da die hier bearbeiteten Klassen repetitiver Elemente eine Besonderheit der Hefe Saccharomyces cerevisiae darstellen, muß es bis auf weiteres dahingestellt bleiben, ob in anderen eukaryotischen Organismen die tRNA-Genexpression möglicherweise über ähnliche Sequenzelemente gesteuert wird.

6. Literaturverzeichnis

1 Smith, J.D. (1976) Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. **16**, 25-73

2 Nakajama, N., Ozeki, H. und Shimura, Y. (1981) Cell **23**, 239-249

3 Feldmann, H. (1977) Nucl. Acids Res. **4**, 2831-2841

4 Zasloff, M. und Santos, T. (1981) Cell **23**, 699-709

5 Clarkson, S.G. (1983) In: Eukaryotic Genes, pp. 239-261, Maclean, N., Gregory, S.P. und Flavell, R.A. (Herausg.), Butterworths Press

6 Shibuya, K., Noguchi, S., Nishimura, S. und Sekiya, T. (1982) Nucl. Acids Res. **10**, 4441-4448

7 Ritossa, F.M. und Spiegelmann, S. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **53**, 737-745

8 Weber, K. und Berg, D. (1970) Biochemistry **9**, 5055-5065

9 Clarkson, S.G., Kurer, V. und Smith, H.O. (1978) Cell **14**, 713-724

10 Havemann, B., Sharp, S., Yamada, H. und Söll , P. (1980) Cell **19**, 889-895

11 Robinson, R.R. und Davidson, N. (1981) Cell **23**, 251-259

12 Hosbach, H.A., Silberklang, M. und McCarthy, B.J. (1980) Cell **21**, 169-178

13 DeFranco, D., Schmidt, O. und Söll, D. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **77**, 3365-3368

14 Schweizer, E., MacKechnie, C. und Halvarson, H.O. (1969) J. Mol. Biol. **40**, 261-277

15 Feldmann, H. (1976) Nucl. Acids Res. **3**, 2379-2386

16 Olson, M.V., Hall, B.D., Cameron, J.R. und Davis, R.W. (1979) J. Mol. Biol. **127**, 285-295

17 Mortimer, R.K. und Hawthorne, D. (1973) Genetic **74**, 33-42

18 Goodman, H.M., Olson, M.V. und Hall, B.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 5453-5457

19 Page, G.S. und Hall, B.D. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 921-934

20 Olson, M.V., Page, G.S., Sentenac, A., Piper, P.W., Worthington, M., Weiss, R.B. und Hall, B.D. (1981) Nature **291**, 464-469

21 Olah, J. und Feldmann, H. (1980) Nucl. Acids Res. **8**, 1975-1986

22 Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop, R. und Rutter, W.J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 190-194

23 Feldmann, H., Olah, J. und Friedenreich, H. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 2949-2959

24 Eigel, A., Olah, J. und Feldmann, H. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 2961-2970

25 Eigel, A. und Feldmann, H. (1982) EMBO J. **1**, 1245-1250

26 Baker, R.E., Eigel, A., Vögtel, D. und Feldmann, H. (1982) EMBO J. **1**, 292-295

27 Hofstetter, H., Kressmann, A. und Birnstiel, M.L. (1981) Cell **24**, 573-585

28 Folk, R.W. und Hofstetter, H. (1983) Cell **33**, 585-593

29 Traboni, C., Ciliberto, G. und Cortese, R. (1984) Cell **36**, 179-187

30 Ciliberto, G., Castagnoli, L., Melton, D.A. und Cortese, R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 1198-1199

31 Allison, D.S., Goh, S.H. und Hall, B.D. (1983) Cell **34**, 655-664

32 Newman, A.J., Ogden, R.C. und Abelson, J. (1983) Cell **35**, 117-125

33 Sharp, S., DeFranco, D., Dingermann, T., Farrell, P. und Söll, D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 6657-6661

34 Sharp, S., Dingermann, T., Schaack, J., DeFranco, D. und Söll, D. (1983) Journal of Biological Chemistry **4**, 2440-2446

35 Arnold, G.J., Schmutzler, C., Ulrich, T., van Tol, H. und Gross, H.J. (1986) Gene, im Druck

36 Larson, D., Bradford-Wilcox, J., Young, L.S. und Sprague, K.U. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 3416-3420

37 Hipskind, R.A. und Clarkson, S.G. (1983) Cell **34**, 881-890

38 Shaw, K.J. und Olson, M.V. (1984) Mol. Cell. Biol. **4**, 657-665

39 Tschumper, G. und Garbon, J.A. (1982) J. Mol. Biol. **156**, 293-307

40 DelRey, F.J., Donahue, T.F. und Fink, G.R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 4138-4142

41 Sandmeyer, S.B. und Olson, M.V. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 7674-7678

42 Genbauffe, F.S., Chisholm, G.E. und Cooper, T.G. (1984) J. Biol. Chem. **259**, 10518-10525

43 Chisholm, G.E., Genbauffe, F.S. und Cooper, T.G. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**, 2965-2969

44 Andreadis, A., Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B. und Schimmel, P. (1982) Cell **31**, 319-325

45 Cameron, J.R., Loh, E.Y. und Davis, R.W. (1979) Cell **16**, 739-751

46 Gafner, J., DeRobertis, E.M. und Philippsen, P. (1984) EMBO J. **2**, 583-591

47 Hauber, J., Nelböck-Hochstetter, P. und Feldmann, H. (1985) Nucl. Acids Res. **13**, 2745-2758

48 Chaleff, D.T. und Fink, G.R. (1980) Cell **21**, 227-237

49 Roeder, G.S. und Fink, G.R. (1980) Cell **21**, 239-249

50 Williamson, V.E., Young, E.T. und Ciriacy, M. (1981) Cell **23**, 605-614

51 Errede, J.F., Stewart, J.W. und Sherman, F. (1981) Cell **25**, 427-436

52 Rubin, G.M. (1983) In: Mobile Genetic Elements, pp. 299-328, Shapiro, J.A. (Herausg.), Academic Press

53 Varmus, H.E. (1983) In: Mobile Genetic Elements, pp. 411-503, Shapiro, J.A. (Herausg.), Academic Press

54 Boeke, J.D., Garfinkel, D.J., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1985) Cell **40**, 491-500

55 Garfinkel, D.J., Boeke, J.D. und Fink, G.R. (1985) Cell **42**, 507-517

56 Mellor, J., Malim, M.H., Gull, K., Tuite, M.F., McCready, S., Dibbayawan, T., Kingsman, S. und Kingsman, A.J. (1985) Nature **318**, 583-586

57 Farabaugh, P.J. und Fink, G.R. (1980) Nature **286**, 352-356

58 Gafner, J. und Philippsen, P. (1980) Nature **286**, 414-418

59 Roeder, G.S. und Fink, G.R. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**, 5621-5625

60 Roeder, G.S. und Fink, G.R. (1983) In: Mobile Genetic Elements, pp. 299-328, Shapiro, J.A. (Herausg.), Academic Press

61 Kingsman, A.J., Gimlich, R.L., Clarke, L., Chinault, A.C. und Carbon, J.A. (1984) J. Mol. Biol. **145**, 619-632

62 Clare, J. und Farabough, P.J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 2829-2833

63 Errede, B., Company, M., Ferchak, J.D., Hutchison III, C.A. und Yarnell, W.S. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 5423-5427

64 Roeder, G.S., Rose, A.B. und Perlman, R.E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**, 5428-5432

65 Williamson, V.M. (1984) Int. Rev. Cytol. **83**, 1-25

66 Hohn, B. (1975) J. Mol. Biol. **92**, 93-106

67 Sternberg, N., Tiemeier, D. und Enquist, L. (1977) Gene **1**, 255-280

68 Hohn, B. und Hinnen, A. (1980) In: Genetic Engineering Vol. 2, pp. 169-183, Setlow, J.K. und Hollaender, A. (Herausg.), Plenum Press

69 Bender, W., Spierer, P. und Hogness, D.S. (1983) J. Mol. Biol. **168**, 17-33

70 Weiss, E.H., Golden, L., Fahrner, K., Mellor. A.L., Devlin, J.J., Bullman, H., Tiddens, H., Bud, H. und Flavell, R.A. (1984) Nature **310**, 650-655

71 Steinmetz, M. (1984) Trends in Biochem. Sci. **8**, 224-226

72 Steinmetz, M., Winoto, A., Minard, K. und Hood, L. (1982) Cell **28**, 489-498

73 Grosveld, F.G., Dahl, H.H.M., DeBoer, E. und Flavell, R.A. (1981) Gene **13**, 227-237

74 Messing, J., Crea, R. und Seeburg, P.H. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 309-321

75 Nelböck, P., Stucka, R. und Feldmann, H. (1985) Biol. Chem. Hoppe-Seyler **366**, 1041-1051

76 Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 5463-5467

77 Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. und Folkon, S. (1977) Gene **2**, 95-113

78 Sutcliffe, J.G. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 3738-3741

79 Rackwitz, H.R., Zehetner, G., Frischauf, A.-M. und Lehrach, H. (1984) Gene **30**, 195-200

80 Rackwitz, H.R., Zehetner, G., Murialdo, H., Delius, H., Chai, J.H., Poustka, A., Frischauf, A.-M. und Lehrach, H. (1985) Gene **40**, 259-266

81 Messing, J. (1983) In: Methods in Enzymology Vol. 101, pp. 20-78, Wu, R., Grossman, L. und Moldave, K. (Herausg.), Academic Press

82 Vieira, J. und Messing, J. (1982) Gene **19**, 259-264

83 Clarke, L. und Carbon, J. (1976) Cell **9**, 91-99

84 Serfling, E., Jasin, M. und Schaffner, W. (1985) TIG **1**, 224-230

85 Lamond, A.J. und Travers, A.A. (1983) Nature **305**, 248-250

86 Guarente, L. (1984) Cell **36**, 799-800

87 Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, D. und Smith, M. (1978) J. Biol. Chem. **253**, 6551-6560

88 Stillmann, D.J. und Geiduschek, E.P. (1984) EMBO J. **4**, 847-853

89 Dingermann, T., Sharp, S., Schaack, J. und Söll, D. (1983) J. Biol. Chem. **17**, 10395-10402

90 Brown, D.D. (1984) Cell **37**, 359-365

91 Brown, D.D. und Schlissel, M.S. (1985) Cell **42**, 759-767

92 Raymond, K.C., Raymond, G.J. und Johnson, J.D. (1985) EMBO J. **4**, 2649-2656

93 Allison, D.S. und Hall, B.D. (1985) EMBO J. **4**, 2657-2664

94 Wilson, E.T., Larson, D., Young, L.S. und Sprague, K.U. (1985) J. Mol. Biol. **183**, 153-163

95 Brodeur, G.M., Sandmeyer, S.B. und Olson, M.V. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 3292-3296

96 Elder, R.T., Loh, E.Y. und Davis, R.W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 2432-2436

97 Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984) Cell **37**, 67-75

98 Carle, G.F. und Olson, M.V. (1984) Nucl. Acids Res. **12**, 5647-5664

99 Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. **98**, 503-517

100 Orr-Weaver, T.L. und Szostak, J.W. (1985) Microbiological Reviews **49**, 33-58

101 Herskowitz, J. und Oshima, Y. (1981) In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, pp. 181-209, Cold Spring Harbor Laboratory

102 Olson, M.V., Page, G.S., Sentenac, A., Loughney, K., Kurjan, J., Benditt, J. und Hall, B.D. (1980) In: Transfer RNA: Biological Aspects, 267-280, Cold Spring Harbor Laboratory

103 Kressmann, A. und Birnstiel, L. (1980) In: Transfer of Cell Constituents into Eukaryotic Cells, pp. 383-407, NATO Advanced Study Institutes, Series 31

104 Weiher, H., König, M. und Gruss, P. (1983) Science **219**, 621-631

105 Gargiulo, G., Wasserman, W. und Worcel, A. (1983) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **47**, 549-556

106 Saragosti, S., Moyne, G. und Yaniv, M. (1980) Cell **20**, 65-73

107 Olson, M.V., Loughney, K. und Hall, B.D. (1979) J. Mol. Biol. **132**, 387-410

108 Lin, C.P., Tucker, P.W., Mushinski, J.F. und Blattner, F.R. (1980) Science **209**, 1348-1353

109 Hohn, B. und Collins, J. (1980) Gene **11**, 291-298

110 Ish-Horowicz, D. und Burke, J.F. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 2989-2998

111 Scalenghe, F., Turco, E., Edström, J.E., Pirrota, V. und Melli, M. (1981) Chromosoma **82**, 205-216

112 Hohn, B. und Murray, K. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **74**, 3259-3263

113 Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. pp. 258-259, Cold Spring Harbor Laboratory

114 Leder, P., Tiemeier, D. und Enquist, L. (1977) Science **196**, 175-177

115 Hanahan, D. und Meselson, M. (1980) Gene **10**, 63-67

116 Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977) Science **196**, 180-182

117 Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977) J. Mol. Biol. **113**, 237-251

118 Maniatis, T., Jeffrey, A. und Kleid, D. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **72**, 1184-1188

119 Maxam, A.M. und Gilbert, W. (1980) In: Methods in Enzymology Vol. 65, pp. 499-560, Wu, R. (Herausg.), Academic Press

120 Schnell, H., Steinmetz, M., Zachau, H.G. und Schechter, I. (1980) Nature **286**, 170-173

121 Dugaiczyk, A., Boyer, H.W. und Goodman, H.M. (1975) J. Mol. Biol. **96**, 171-181

122 Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J. und Goodman, H.M. (1977) Science **196**, 1313-1319

123 Wartell, R.M. und Reznikoff, W.S. (1980) Gene **9**, 307-402

124 Ferretti, L. und Sgaramella, V. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 85-94

125 Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979) Gene **6**, 23-28

126 Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523

127 Radloff, R., Bauer, W. und Vinograd, J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **57**, 1514-1521

128 Sanger, F., Coulson, A.R., Barrell, B.G., Smith, A.J.H. und Roe, B.A. (1980) J. Mol. Biol. **143**, 161-178

129 Staden, R. (1980) Nucl. Acids Res. **8**, 3673-3694

130 Pech, M., Jaenichen, H.R., Pohlenz, H.D., Neumaier, P.S., Klobeck, H.-G. und Zachau, H.G. (1984) J. Mol. Biol. **176**, 189-204

131 Barth, L.G. und Barth, J.L. (1959) J. Embryol. Exptl. Morphol. **7**, 210-225

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
As	Aminosäuren
bp	Basenpaar
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
kb	Kilobasenpaar (1000 bp)
kD	Kilodalton
RNA	Ribonukleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute

Lebenslauf

Name:	Hauber
Vorname:	Joachim
Geburtsdatum:	05.10.1955
Geburtsort:	Stuttgart
Name des Vaters:	Hauber, Siegfried; geb. 12.03.1924 verstorben 14.12.1971 Beruf: Buchbindermeister
Name der Mutter:	Hauber, Lilly, geborene Hummel; geb. 08.08.1925
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	römisch-katholisch
Schulbildung:	Volksschule Stuttgart-Ostheim: 1962-1966 Raichberg-Realschule Stuttgart, Mittlere Reife: 1966-1971 Collegium Ambrosianum Stuttgart, Abitur: 1971-1974
Wehrdienst:	01.07.1975 - 30.09.1976
Hochschulstudium:	Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studiengang: Diplom-Biologie Beginn: 1977 Diplomvorprüfung: 1979 Diplomhauptprüfung: 1981 Diplomarbeit : 1981-1982 Institut für Biologie I der Universität Tübingen, Prof. Dr. F. Oberwinkler. Thema: "Charakterisierung des mitochondrialen 5S-RNA-Genes aus *Oenothera villaricae*"
Promotion:	seit 15.10.1983, Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München, Prof. Dr. H. Feldmann.